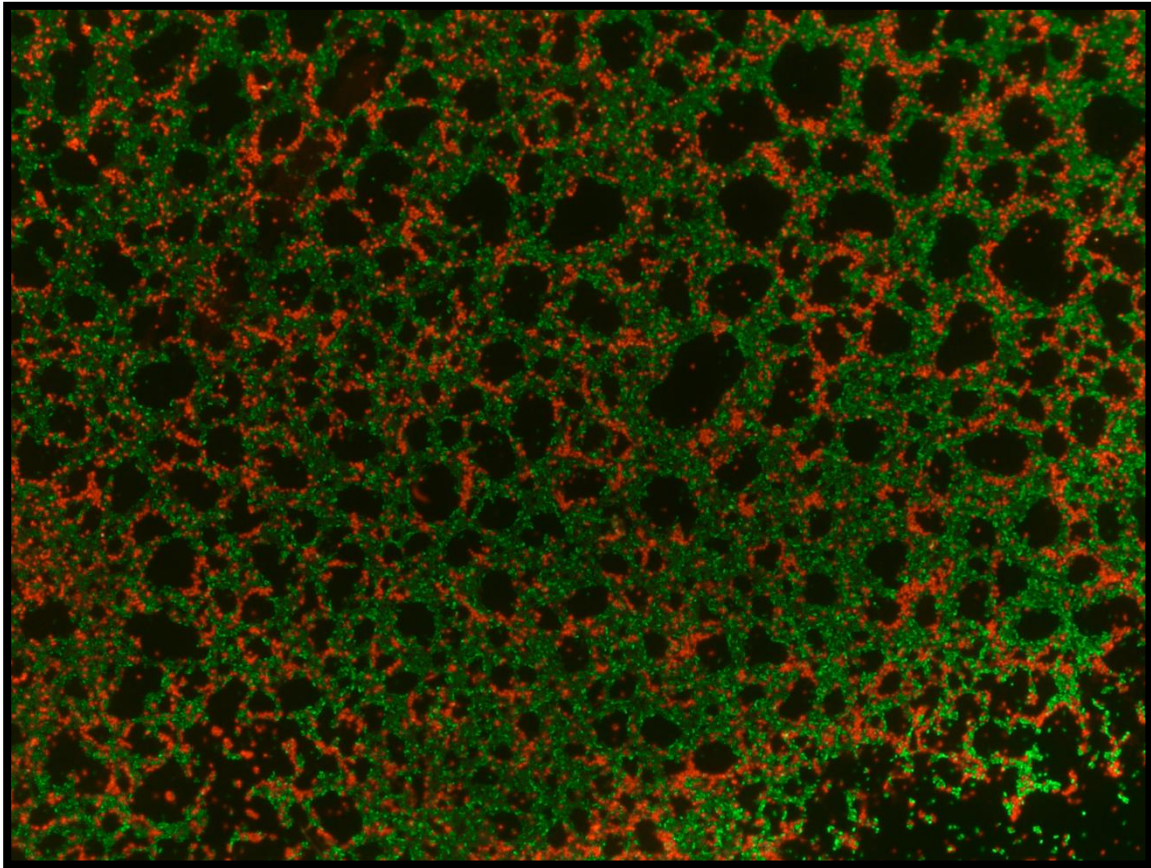


**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE
BIOFILMS POR PARTE DE CEPAS SALVAJES DE *Listeria*
monocytogenes RESISTENTES A AMONIO CUATERNARIO.**

ANÁLISIS, CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN



Albert Berrón Jiménez



Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE
BIOFILMS POR PARTE DE CEPAS SALVAJES DE *Listeria*
monocytogenes RESISTENTES A AMONIO CUATERNARIO.
ANÁLISIS, CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

Albert Berrón Jiménez

Trabajo presentado para la superación de los 15 créditos del Módulo Trabajo Fin de Máster
del Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal

Trabajo dirigido por:

Dr. José Juan Rodríguez Jerez

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Barcelona, Septiembre de 2016

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Grup de Recerca en Anàlisi Microbiològic de Superfícies i Avaluació de Biofilms (AMicS)

José Juan Rodríguez Jerez, Profesor Titular de Nutrición y Bromatología, del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA,

Que el trabajo de investigación titulado: “*Evaluación de la capacidad de formación de biofilms por parte de cepas salvajes de Listeria monocytogenes resistentes a amonio cuaternario. Análisis, cuantificación y detección*” ha sido realizado bajo mi dirección por el **Sr. Albert Berrón Jiménez**, dentro del módulo “Trabajo Fin de Máster” del Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente en Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) a uno de septiembre de dos mil dieciséis.

Dr. José Juan Rodríguez Jerez
Profesor Titular

Agradecimientos

A mis padres, que me han apoyado en todos mis proyectos

A mis amigos, fuente de entretenimiento y conocimiento

A Clara, por su inagotable afecto y por enseñarme a confiar en mí mismo

A Abel y Alfons, compañeros de laboratorio, por la ayuda facilitada

A Carolina Ripollès Avila, por estar a mi lado en toda esta aventura

Al resto de miembros del Laboratorio de Higiene, por aceptarme como uno más del equipo

Al Dr. José Juan Rodríguez Jerez, por sus innumerables consejos y por compartir su sabiduría

Índice

0. Lista de abreviaturas.....	1
1. Resumen / Abstract.....	2
2. Introducción.....	4
2.1 Seguridad alimentaria.....	4
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.3 Brotes más trascendentes de listeriosis registrados.....	6
2.4 Biofilms.....	7
2.4.1 Desarrollo y formación de biofilms.....	7
2.4.2 Matriz extracelular de sustancias poliméricas.....	8
2.4.3 Mecanismos de resistencia de los biofilms.....	10
2.4.4 Microorganismos formadores de biofilms.....	10
2.5 Biofilms en la industria alimentaria.....	11
2.5.1 Biofilms en la industria agrícola.....	12
2.5.2 Biofilms en la industria láctea.....	12
2.5.3 Biofilms en la industria avícola.....	13
2.5.4 Biofilms en la industria cárnica.....	13
2.5.5 Biofilms en la industria del procesado de pescado.....	13
2.5.6 Biofilms en productos listos para el consumo.....	13
2.6 Métodos de detección de biofilms.....	14
2.7 Métodos de control y erradicación de biofilms.....	15
2.8 Objetivos del trabajo.....	15
3. Materiales y métodos.....	16
3.1 Superficies.....	16
3.2 Recuperación de cepas liofilizadas.....	16
3.3 Desarrollo de los ensayos de <i>L. innocua</i>	17
3.3.1 Preparación del inóculo.....	17
3.3.2 Formación del biofilm.....	17
3.3.3 Tratamientos.....	17
3.4 Desarrollo de los ensayos de <i>L. monocytogenes</i>	18
3.4.1 Preparación del inóculo.....	18
3.4.2 Formación del biofilm.....	18

3.4.3 Tratamientos.....	19
3.5 Evaluación por DEM.....	19
3.6 Evaluación por TEMPO®.....	20
3.7 Evaluación por BioFinder®.....	21
3.8 Análisis estadísticos.....	21
4. Resultados y discusión.....	21
4.1 Formación de biofilms por <i>Listeria innocua</i>	21
4.1.1 Evaluación del tiempo óptimo de incubación para la formación de biofilms en superficies de acero inoxidable.....	21
4.1.2 Crecimiento de <i>L. innocua</i> con aplicación de lavados sucesivos.....	25
4.2 Formación de biofilms por <i>Listeria monocytogenes</i>	28
4.2.1 Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> bajo distintas condiciones de incubación.....	28
4.2.1.1 Evaluación por DEM.....	28
4.2.1.2 Evaluación por Biofinder.....	32
4.2.2 Comparación del recuento obtenido por TEMPO y por análisis de imágenes.....	33
5. Conclusiones.....	38
6. Bibliografía.....	40

0. Lista de abreviaturas

ADN: “Ácido Desoxirribonucleico”

AENOR: “Asociación Española de Normalización y Certificación”

AFNOR: “Asociación Francesa de Normalización”

ANOVA: “Análisis de la Variancia”

APPCC: “Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos”

CECT: “Colección Española de Cultivos Tipo”

CSLM: “Microscopía Láser de Escaneo Confocal”

DEM: “Microscopía de Epifluorescencia Directa”

EEUU / USA: “Estados Unidos de América”

eDNA: “Ácido Desoxirribonucleico Extracelular”

EFSA: “European Food Safety Authority (Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria)”

EPS: “Sustancias Poliméricas Extracelulares”

ETA: “Enfermedad de Transmisión Alimentaria”

INIA: “Instituto Nacional de Investigación y tecnología Agraria y Alimentaria”

log: “Logaritmo en base 10”

µg: “Microgramo”

mL y µL: “Mililitro” y “Microlitro”

NMP: “Técnica del Número Más Probable”

OMS / WHO: “Organización Mundial de la Salud”

p: “valor p”

Rto: “Recuento”

SBE: “Suspensión Bacteriana de Ensayo”

SEM: “Microscopía Electrónica de Barrido”

T^aAmb: “Temperatura Ambiente”

TSA: “Tryptic Soy Agar”

TSB-T: “Tryptic Soy Broth”

TSS: “Solución Salina de Triptona”

TSYEB: “Tryptone Soy Yeast Extract Broth (Caldo con triptona, soja y extracto de levadura)”

1. Resumen

La listeriosis es una de las enfermedades transmitida por los alimentos que presenta una sintomatología más grave, por ello el control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria es, actualmente, una importante preocupación.

En el presente estudio, se utilizaron tres cepas distintas de *Listeria spp.* para determinar su capacidad de formación de biofilms sobre superficies de acero inoxidable y bajo diferentes condiciones. Se utilizó una cepa de *Listeria innocua* para investigar el tiempo de incubación necesario para la formación de biofilms maduros, estableciendo dicho tiempo en una semana. Con las otras dos cepas, de *Listeria monocytogenes*, se estudió su adherencia y crecimiento, a diferentes temperaturas de incubación (temperatura ambiente, 30°C y 10°C) y con la aplicación de un recubrimiento proteico o no, sobre las superficies. Los resultados fueron obtenidos por microscopia de epifluorescencia directa (DEM) y TEMPO, para así comprobar la eficacia de ambos métodos.

Se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$), entre los valores obtenidos por DEM y por TEMPO, siendo el recuento obtenido por microscopía superior al obtenido por TEMPO. Se observó que la aplicación de un recubrimiento proteico no influía significativamente en el desarrollo de biofilms ($p = 0.5010$) y que no había diferencias significativas en el crecimiento obtenido para las distintas cepas estudiadas ($p = 0.9455$). En cambio, si se apreciaron diferencias significativas en el crecimiento de este patógeno bajo las diferentes temperaturas de incubación planteadas ($p < 0.05$).

Palabras clave: *Listeria*, biofilm, acero inoxidable, DEM, TEMPO.

1. Abstract

Listeriosis is a foodborne disease that shows symptoms of high severity. Nowadays, the control of *Listeria monocytogenes* is a major concern in the food industry.

In this study, three different strains of *Listeria spp.* were used in order to define their biofilm formation aptitudes over stainless steel surfaces and in different environmental situations. A *Listeria innocua* strain was used to determine the time needed to develop a well-formed biofilm, this time was established in a week of cultivation. Also, the adherence and growth of *Listeria monocytogenes* in stainless steel surfaces, incubated under different temperatures (room temperature, 30°C and 10°C) and with the application or not, of a protein layer over the surfaces, was carried out with the other two strains. The results, were obtained with direct epifluorescence microscopy (DEM) and with TEMPO, so the effectiveness of these two methods was compared.

Significant differences ($p < 0.05$) were observed between the results obtained by DEM and by TEMPO, being the results achieved with microscopy much higher than the other ones. No significant differences were obtained between the treatments ($p = 0.5010$), neither with the strains used ($p = 0.9455$). However, significant differences were obtained between the bacteria grown under different temperatures ($p < 0.05$).

Key words: *Listeria*, biofilm, stainless steel, DEM, TEMPO.

2. Introducción

Muchas bacterias patógenas pueden permanecer viables en forma de biofilm, incluso tras procesos de limpieza y desinfección. Estas son capaces de adherirse a las superficies de contacto con los alimentos, donde pueden constituir el origen de procesos de contaminación bacteriana, produciendo alteraciones en los alimentos o transmitiendo importantes enfermedades (Frank y Koffi, 1990; Carpentier y Cerf, 1993; Vogel et. al., 1997).

Los biofilms son estructuras complejas que presentan adaptaciones fisiológicas sustanciales al medio que los rodea, son capaces de adherirse de forma estable sobre distintas superficies, gracias a la acción de su matriz extracelular de sustancias poliméricas (Wingender et. al., 1999). Cuando se adhieren a superficies alimentarias, pueden actuar como vector de transmisión de patógenos, ocasionando importantes problemas al sector (Kusumaningrum et, al., 2003). Las bacterias se pueden separar de las superficies al contactar con los alimentos, afectando gravemente a su calidad e inocuidad y suponer un importante peligro para los consumidores (Bagge-Ravn et. al., 2003). Las células que conforman los biofilms presentan muchas resistencias a los productos de higiene, desinfectantes y antibióticos, por lo que su control y erradicación puede resultar muy complejo y costoso (Simões et. al., 2010).

2.1 Seguridad alimentaria

Una de las mayores preocupaciones de salud pública son las enfermedades alimentarias causadas por microorganismos patógenos (Bhagwat, 2003), especialmente las diarreicas, que presentan unos elevados índices de morbilidad y mortalidad (WHO, 2007). La seguridad alimentaria hace referencia a todas aquellas circunstancias que preservan la calidad de los alimentos, permiten prevenir su contaminación y evitan la aparición de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) (Gisella Kopper et. al., 2009). Una ETA es definida, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como “todo aquel conjunto de sintomatologías que pueden afectar a la salud del consumidor, originadas por la ingesta de agua o alimentos contaminados, por agentes biológicos o químicos”.

Junto con la aparición de agentes patógenos emergentes, los cambios en el estilo de vida y hábitos alimenticios, la producción intensiva, la comercialización a nivel mundial y el aumento del número de consumidores, son los responsables de que los problemas de inocuidad alimentaria estén en constante cambio y comporten potenciales riesgos para la salud de la población (OMS, 2002).

La aparición de un brote ocurre cuando dos o más personas padecen unos síntomas similares, tras ingerir un mismo producto alimenticio (González, 2009). La contaminación de los alimentos puede darse durante el transcurso de tiempo que va, desde la elaboración, hasta el consumo del alimento y puede comportar la aparición de enfermedades de transmisión alimentaria responsables de una gran variedad de síntomas de distinta gravedad; como diarreas, vómitos, otras complicaciones gastrointestinales e incluso problemas inmunológicos, fallos multiorgánicos, cáncer o la muerte (OMS, 2015).

Las bacterias patógenas dominan la lista de enfermedades zoonóticas. Entre las que ocasionan mayor número de brotes se encuentran *Campylobacter*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica*. Por otro lado, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* causan brotes menos numerosos, aunque con elevadas tasas de mortalidad (EFSA, 2015).

Los alimentos pueden ser fácilmente contaminados a lo largo de la cadena de producción, debido a la mala praxis o a un procesado inadecuado. Por este motivo, la implantación de procedimientos como el sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC), las buenas prácticas de higiene y las buenas prácticas de fabricación, son un requisito legal de vital importancia; para evitar la aparición de estos brotes epidemiológicos (Panisello, 2000). La tecnología actual permite la mejora de la calidad microbiológica de muchos productos, pero no garantiza la ausencia de patógenos (Álvarez-Gurrea, 2015).

2.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un microorganismo que se encuentra ampliamente distribuido por todo el planeta y es capaz de sobrevivir bajo condiciones extremas de pH, temperatura y salinidad (Cole et. al., 1990). Se conocen tres linajes genéticos distintos, que difieren en aspectos de virulencia y de capacidad de transmisión a humanos (Wiedmann et. al., 1997). Se cree que los distintos serotipos de *L. monocytogenes*, se pueden distinguir en función de las estructuras poblacionales que forman y de su habilidad para combatir el estrés ambiental (Wiedmann et. al., 1997; Dunn et. al., 2009). Estas bacterias son relativamente resistentes a elevadas concentraciones de sal y a bajas temperaturas, por lo que están capacitadas para crecer bajo condiciones de refrigeración (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007).

L. monocytogenes representa una importante preocupación para la industria alimentaria. Debido a su habilidad para reproducirse en una amplia variedad de condiciones ambientales, es capaz de contaminar un importante espectro de alimentos (Kathariou, 2002), que actúan como reservorio y les permiten entrar en el tracto digestivo de los consumidores (Chae y Schraft,

2000). Este microorganismo constituye un significativo riesgo para la salud humana, ya que es un importante agente patógeno, que origina elevados índices de hospitalización y mortalidad (Gandhi y Chikinidas, 2007; Koo et. al., 2014). La enfermedad que causa es conocida como listeriosis y su adquisición se debe generalmente al consumo de alimentos contaminados (Ferreira et. al., 2014). Afecta mayoritariamente a grupos de riesgo, como ancianos, personas con inmunodepresión, recién nacidos o embarazadas (Lomonaco, et. al., 2015). La incidencia de la listeriosis a nivel mundial, oscila entre 0.1 y 11.3 casos al año, por millón de habitantes (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). Pese a que tiene una baja incidencia entre la población humana, en 2012 la mortalidad asociada a este microorganismo osciló entre el 20 y el 30% y originó unos costes económicos de 2.6 billones de dólares, sólo en EEUU (Hoffmann et. al., 2012).

El rediseño de numerosos alimentos y el rechazo de lotes, por no conformidades de los departamentos de calidad, debido a la permanencia de *L. monocytogenes* en las plantas de producción, incrementa de manera significativa los costes económicos en la industria alimentaria (Ferreira et. al., 2014).

2.3 Brotes más trascendentes de listeriosis registrados

Se han dado importantes brotes de listeriosis, de forma repetida, a lo largo del tiempo. Este patógeno se ha aislado en una amplia variedad de productos alimenticios, como en los quesos blandos y otros productos lácteos (Pini y Gilbert, 1988; Harvey y Gilmour, 1992), en productos cárnicos (Gilbert et. al., 1993), en productos de la pesca (Eklund et. al., 1995) o en vegetales (Beuchat, 1996).

Linnan y colaboradores (1988) notificaron la aparición de un brote de listeriosis, relacionado con el consumo de queso estilo mexicano en California, que afectó a 93 personas. En el año 2000, se dio una importante crisis en Francia, con al menos 26 intoxicaciones por *Listeria*, como resultado de la contaminación de distintos productos cárnicos (El País, 2000). En 2005, dos personas murieron en Suiza por el consumo de queso Vacherin Mont d'Or contaminado (Swissinfo, 2005). Little y colaboradores (2010) realizaron un estudio en el que atribuían, primariamente los casos de listeriosis en el Reino Unido, a alimentos preparados, como sándwiches o ensaladas mixtas, seguidos por pescado y carne. Los quesos duros y semiblandos, junto con los alimentos listos para el consumo, elaborados con productos cárnicos o de pescado, fueron los que registraron una mayor cuantía de positivos para *Listeria monocytogenes* en 2011 (EFSA, 2014).

2.4 Biofilms

En el medio ambiente, las bacterias se pueden encontrar en estado planctónico o en estado sésil, formando agregados microbianos que se adhieren a superficies sólidas, que se mantienen unidos entre sí, gracias a la acción de una matriz extracelular de sustancias poliméricas (EPS) altamente hidratada. Estas comunidades microbianas adheridas a superficies son conocidas como biofilms (Costerton, 1995).

Los biofilms se pueden encontrar tanto en la naturaleza, como en la industria alimentaria, siempre que en las superficies donde se adhieran haya una disponibilidad de nutrientes suficiente para mantener su crecimiento y viabilidad (Kumar y Anand, 1998). Las células que forman estos biofilms pueden adquirir nuevas características a través de la transferencia horizontal de genes, están protegidas de las fluctuaciones ambientales y pueden cooperar entre ellas, para acceder a una mayor disponibilidad de alimentos e incrementar su eficiencia metabólica (Davey y O'toole, 2000).

2.4.1 Desarrollo y formación de biofilms

La presencia de microorganismos sobre superficies alimentarias pone en peligro la inocuidad de los alimentos, que están en contacto con ellas. Por este motivo, el modo en el que se originan los biofilms es un importante punto de estudio para la industria alimentaria (Shi y Zhu, 2009).

El ciclo de vida de los biofilms (Fig. 1) consta de 5 fases diferenciadas. En la primera etapa se da una fijación inicial débil y reversible, donde las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular de las bacterias (van Loosdrecht et. al., 1990) y la acumulación de residuos orgánicos, sobre las superficies de contacto con alimentos (Hood y Zottola, 1997), pueden actuar como condicionante y favorecer la adhesión inicial de las células y el posterior desarrollo del biofilm. Actualmente, se sabe que las células se adhieren al sustrato a través de fuerzas de Van der Waals (Chew y Yang, 2016).

En la segunda fase se da la adhesión irreversible, diferentes interacciones covalentes e hidrofóbicas se dan en esta fase (Kumar y Anand, 1998), las células se unen entre ellas y con la superficie de forma permanente (Chmielewski y Frank, 2003). La fijación ocurre gracias a la acción de distintos apéndices de las bacterias, como los flagelos, las fimbrias o los pilis (Donlan, 2002) y por la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (Flemming et. al., 2007).

El proceso de maduración es bastante lento, pero dependiendo de las condiciones de cultivo, el biofilm puede alcanzar un grosor de unos pocos milímetros en cuestión de días (Melo et. al.,

1992). La maduración del biofilm se da en dos fases. En la primera, se forman pequeñas agrupaciones y multicapas de células bacterianas que se entrelazan con la matriz de sustancias poliméricas (EPS) formando grandes microcolonias (Chew y Yang, 2016). Posteriormente, muchas células se separan del sustrato para formar canales de migración y de comunicación entre las distintas agrupaciones que conforman el biofilm (Bryers y Ratner, 2004).

Tras la maduración del biofilm, se despegan subpoblaciones de células de la superficie y se dispersan, con el objetivo de colonizar nuevos ambientes (Marshall, 1992). Esta última etapa es conocida como fase de dispersión.

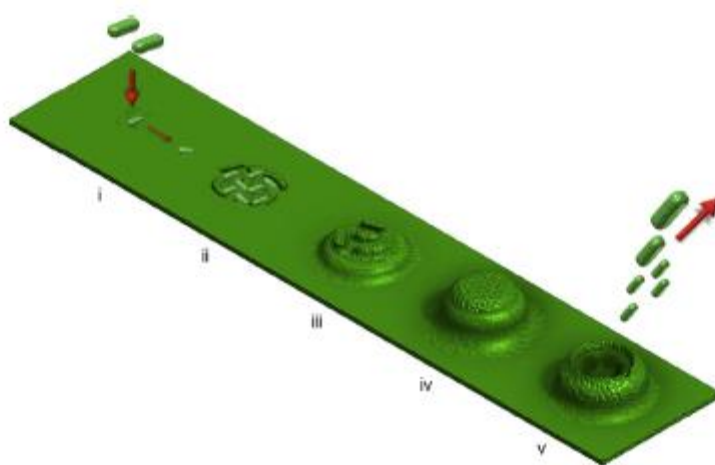


Fig. 1. Etapas principales de la formación de biofilms: (i) adhesión reversible, (ii) adhesión irreversible, (iii) maduración I, (iv) maduración II, (v) dispersión (Chew y Yang, 2016)

2.4.2 Matriz extracelular de sustancias poliméricas

En la mayoría de biofilms, el recuento total de microorganismos no supone más del 10% de su masa total en seco, el restante 90% corresponde a la matriz extracelular, producida por las propias bacterias, en la que están incrustadas las células del biofilm (Flemming y Wingender, 2010). Esta matriz es una red tridimensional de polímeros cohesionada, que confiere estabilidad mecánica al biofilm y favorece su adhesión a las superficies (Flemming et. al., 2007). Estas estructuras biológicas contribuyen a mejorar la resistencia y persistencia de los microorganismos en diferentes ambientes (Bridier et. al., 2014).

Las EPS están formadas por exopolisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otras sustancias poliméricas (Fig. 2) (Sutherland, 2001; Chmielewski y Frank, 2003). Las proteínas

juegan un papel importante en la estructura y fisiología del biofilm. Permiten la digestión de macromoléculas exógenas para la adquisición de nutrientes y realizan la degradación de los componentes de la EPS (Wingender et. al., 1999). También están involucradas en otras actividades enzimáticas del biofilm (Lynch et. al., 2007). Las lectinas conectan las distintas bacterias con la red de exopolisacáridos, estabilizando la matriz extracelular (Flemming y Wingender, 2010).

También se ha encontrado ADN extracelular (eDNA) en la EPS de biofilms formados por bacterias Gram positivas y Gram negativas (Rice et. al., 2007; Izano et. al., 2008). Este, participa en las etapas tempranas de formación del biofilm, aunque se ha demostrado que puede tener otras implicaciones en función del microorganismo que lo forma (Whitchurch et. al., 2002; Yang et. al, 2007; Vilain et. al., 2009).

Los exopolisacáridos, que normalmente son el componente mayoritario de las EPS, cohesionan las distintas células bacterianas entre sí, confieren una barrera protectora contra la desecación y pueden ayudar en la absorción de cationes como el calcio o el manganeso (Chew y Yang, 2016).

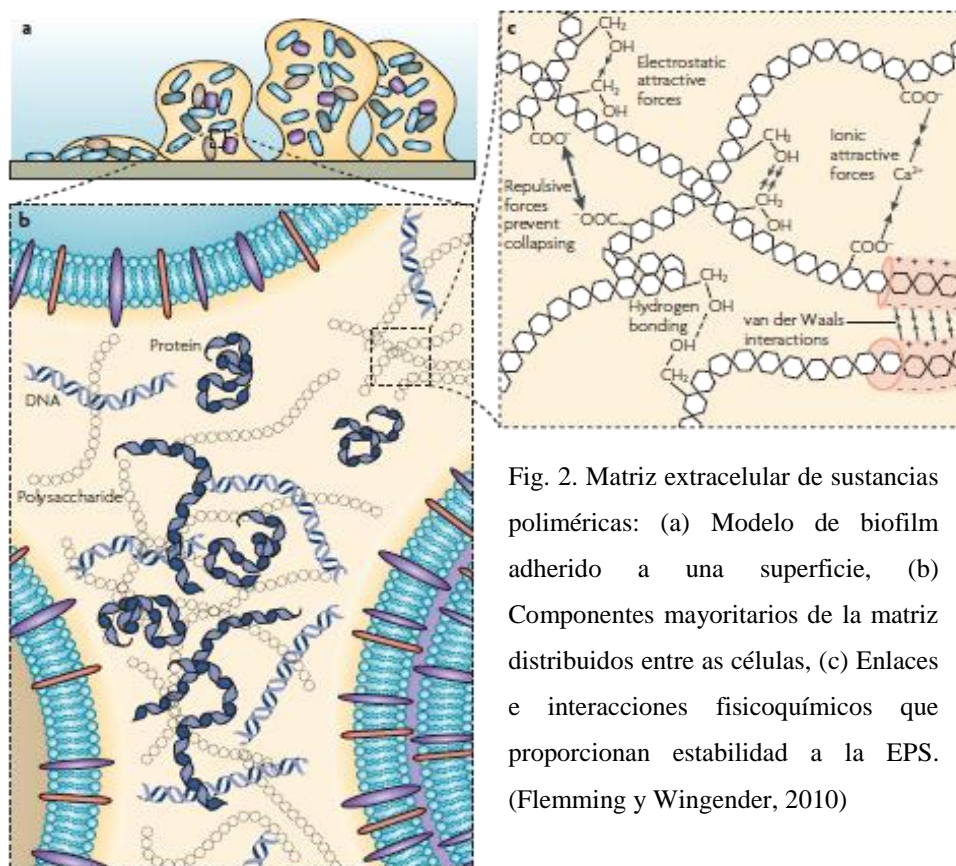


Fig. 2. Matriz extracelular de sustancias poliméricas: (a) Modelo de biofilm adherido a una superficie, (b) Componentes mayoritarios de la matriz distribuidos entre as células, (c) Enlaces e interacciones fisicoquímicos que proporcionan estabilidad a la EPS. (Flemming y Wingender, 2010)

2.4.3 Mecanismos de resistencia de los biofilms

Los biofilms que forma *L. monocytogenes* sobre superficies alimentarias presentan una elevada resistencia a métodos de higienización y desinfectantes tradicionales, como el amonio cuaternario (Mustapha y Liewen, 1989, Frank y Koffi, 1990), debido a la penetración parcial de estos agentes en el biofilm (Huang et. al., 1995). En cambio, la resistencia que exhiben los biofilms frente a algunos antibióticos, puede venir dada por la producción de enzimas degradadoras, como las β -lactamasas (Kumar y Anand, 1998).

Los biofilms muestran una mayor resistencia a tratamientos antimicrobianos que las bacterias planctónicas en suspensión (Lewis, 2001), ya que una de las características que definen a estas estructuras, es que una vez se han desarrollado sobre una superficie o un alimento resulta muy difícil eliminarlas utilizando métodos de limpieza y desinfección tradicionales (Baumann et. al., 2009).

Algunos de los mecanismos que originan esta resistencia de los biofilms son, la capacidad de algunas bacterias de generar una respuesta de defensa activa frente a los desinfectantes (van Houdt et. al., 2010) o la protección que confiere la matriz de EPS, que actúa como una barrera que permite reducir de manera significativa la penetración de los agentes antimicrobianos, protegiendo así a las células del interior del biofilm (Xue et. al., 2012).

2.4.4 Microorganismos formadores de biofilms

Des de su descubrimiento en 1943, continuamente aparecen estudios que demuestran la capacidad de formar biofilms por parte de cualquier microorganismo bajo las condiciones ambientales adecuadas (Lasa, 2004).

Se ha demostrado, que la formación de biofilms y la supervivencia de *Yersinia spp.*, *Aeromonas spp.* y *Enterococcus spp.*, en vidrio y acero inoxidable depende de la humedad relativa del ambiente (Wirtanen y Mattila-Sandholm, 1993; Mortero et. al., 2003). Diversas bacterias patógenas, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*, tienen la capacidad de formar biofilms y sobrevivir varias horas en manos, indumentarias y utensilios de trabajadores (Jiang y Doyle, 1999; Kusumaningrum et. al., 2003). Los ambientes húmedos que resultan tras procesos de limpieza, pueden promover de manera acentuada la multiplicación de estos microorganismos patógenos (Mortero et. al., 2003).

Respecto *L. monocytogenes*, este microorganismo tiene la capacidad de formar biofilms en plástico, polipropileno, caucho, vidrio y acero inoxidable, superficies muy comunes en la

industria alimentaria (Fletcher y Loeb, 1979; Mafu et. al., 1990; Rönner y Wong, 1993; Jeong y Frank, 1994). *L. monocytogenes* forma biofilms fácilmente y bajo esta condición puede subsistir durante extensos periodos de tiempo en las plantas de producción de alimentos (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007).

2.5 Biofilms en la industria alimentaria

La contaminación cruzada es una importante preocupación en la industria alimentaria, que consiste en la transmisión de bacterias desde un origen contaminado a otro no contaminado (Pérez-Rodríguez et. al., 2008). La adhesión de microorganismos, patógenos o alterantes, en superficies de contacto con los alimentos y el posterior desarrollo de biofilms, se puede convertir en una fuente potencial de contaminación de otros alimentos (Lee Wong, 1998). Dicha contaminación se traduce en el deterioro de los alimentos, produciendo así importantes problemas higiénicos y económicos para la industria (Mattila-Sandholm y Wirtanen, 1992).

En la industria alimentaria, la adhesión de microorganismos formadores de biofilms en las superficies es completamente indeseable y contraproducente (Kumar y Anand, 1998). Las bacterias adheridas tienen la capacidad de contaminar los alimentos durante sus etapas de elaboración. Al desprenderse del biofilm, se puede dar la contaminación de los alimentos presentes en la superficie o la contaminación de otras superficies cercanas (Norwood y Gilmour, 1999).

Esta ampliamente documentada la formación de biofilms por parte de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable (Herald y Zottola, 1988; Sasahara et. al., 1993; Norwood y Gilmour, 1999), pero este patógeno también es capaz de adherirse a otras superficies como el vidrio, el polipropileno o el caucho (Mafu et. al., 1990). A través de la contaminación cruzada *L. monocytogenes* puede contaminar alimentos crudos durante las etapas de tratamiento, empaquetado y almacenamiento (Vazquez-Boland, 2001).

A parte de los microorganismos, los materiales que se encuentran en la industria alimentaria también juegan un papel importante en la adhesión celular y formación de biofilms (Srey et. al., 2012). Entre los materiales más propensos a ser contaminados, se encuentran las superficies, los utensilios, los equipos y la maquinaria. Es decir, todos aquellos objetos que pueden contactar, de forma directa o indirecta, con los productos alimenticios (Álvarez-Gurrea, 2015).

Las superficies con defectos, grietas, poros o articulaciones son las más propensas a permanecer con suciedad, de manera que proporcionan a los microorganismos de un excelente medio de

cultivo para la formación de biofilms (Taylor et. al., 1998). Otros aspectos de diseño de los equipos, las soldaduras o las esquinas también son importantes factores que pueden estimular la formación de biofilms (Guðbjörnsdóttir et. al, 2005).

Mientras que algunos autores creen que la rugosidad de los materiales posee un rol determinante en la adherencia de los microorganismos a las superficies alimentarias (Howell y Behrends, 2006; Scardino et. al., 2006), otros investigadores piensan todo lo contrario (Chia et. al., 2009). Dichas diferencias de apreciación, pueden ser debidas a la utilización de superficies con distinto grado de pulido (Chia et. al., 2009). En acero inoxidable, se ha demostrado que las bacterias se adhieren menos a superficies pulidas, que en no pulidas (Arnold et. al., 2004).

Los materiales más comúnmente utilizados son el acero inoxidable, el caucho, el vidrio, la madera y el poliuretano (Chia et. al., 2009). Adetunji e Isola (2011) investigaron la formación de biofilms en distintas superficies; concluyeron que la madera estimulaba la formación de biofilms debido a su porosidad y que la superficie lisa del vidrio era ideal para el desarrollo de estas estructuras debido a su resistencia a la corrosión.

2.5.1 Biofilms en la industria agrícola

En esta industria, la contaminación cruzada se da en las etapas fundamentales de procesamiento, corte, lavado, enjuagado, secado y empaquetado (Suslow, 2001). Ni el lavado con peróxido de hidrogeno (Sapers y Sites, 2003), ni con hipoclorito de sodio (López-Gálvez et. al., 2010), ha demostrado ser eficiente en la eliminación de biofilms formados por *E. coli* en distintas verduras. Los productos agrícolas generalmente se consumen crudos, por lo que su incorrecta manipulación tras la cosecha puede conducir a problemas de contaminación (Srey et. al., 2012).

2.5.2 Biofilms en la industria láctea

Una amplia variedad de bacterias tienen la capacidad de generar biofilms en productos lácteos (Flint et. al., 1997). Los principales microorganismos que pueden desarrollarse en la industria láctea son los pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (Wiedmann et. al., 2000), *Listeria* (Waak et. al., 2002), *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, (Sharma y Anand, 2002) y *Enterobacter* (Salo et. al., 2006).

En la industria láctea, la formación de biofilms depende de muchos factores. La leche es un producto perecedero, muy susceptible a la contaminación por diferentes especies bacterianas, siendo los principales focos los equipos deficientemente limpiados y desinfectados (Jessen y Lammert, 2003).

Se ha verificado que, *L. monocytogenes* crece más lentamente conservada a temperatura de refrigeración y con una humedad relativa del 75%, en leche pasteurizada (Helke y Wong, 1994) y se ha observado la presencia de este microorganismo en los equipos y materiales de ordeño, motivo por el que puede representar un peligro para la industria y se le tiene que prestar especial atención (Latorre et. al., 2010).

2.5.3 Biofilms en la industria avícola

Las heces, el pienso y el transporte de animales vivos son las principales fuentes de contaminación en esta industria (Marin et. al., 2002). Un patógeno usualmente encontrado durante el procesamiento de aves es *Campylobacter jejuni* (Deming et. al., 1987; Sanders et. al., 2007), aunque su adhesión viene determinada por la existencia previa de otros biofilms en las superficies (Hanning et. al., 2008). Sin embargo, la principal preocupación en la industria avícola es la adhesión de *Salmonella* en las distintas superficies que la conforman (Chia et. al., 2009).

2.5.4 Biofilms en la industria cárnica

Se ha estudiado la adhesión y formación de biofilms por parte de *E. coli* O157: H7 en superficies en contacto con carnes de ganado, concluyendo que a temperaturas de refrigeración las bacterias pueden crecer y desarrollar biofilms (Dourou et. al., 2011). Los restos orgánicos derivados del procesamiento de la carne son un medio apropiado para el desarrollo de microorganismos y formación de biofilms (Srey et. al., 2012).

2.5.5 Biofilms en la industria del procesamiento de pescado

Muchos microorganismos formadores de biofilms como *Vibrio alginolyticus* (Kogure et. al., 1998), *Vibrio parahaemolyticus* (Enos-Berlage et. al., 2005), *Vibrio cholerae* (Faruque et. al., 2006), *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, *Bacillus spp.*, *Aeromonas spp.* y *Pseudomonas spp.* (Rajkowski, 2009), son capaces de contaminar los productos de la pesca. Los biofilms se pueden encontrar en distintos puntos de la cadena de producción pesquera (Guðbjörnsdóttir et. al., 2005), siendo los sistemas de distribución de agua de mar y los equipos de manipulación los más afectados (Shikongo-Nambabi et. al., 2010).

2.5.6 Biofilms en productos listos para el consumo

Los productos listos para el consumo son alimentos que presentan un elevado riesgo de ser contaminados por bacterias. Los alimentos listos para el consumo no envasados o reenvasados son los más susceptibles de ser contaminados, siendo las salchichas crudas (Wagner et. al.,

2007) y el pescado ahumado (Garrido et. al., 2009), los productos que presentan mayores registros de contaminación. Durante el manejo, procesado y especialmente tras el cocinado de estos alimentos, es cuando se pueden dar con mayor facilidad los procesos de contaminación cruzada (Osaili et. al., 2011).

2.6 Métodos de detección de biofilms

Los métodos de detección de biofilms se han utilizado para cuantificar la cantidad de bacterias presentes en superficies de contacto con alimentos. Los diferentes métodos incluyen la agitación con Vortex (Mustapha y Liewen, 1989), el raspado de las superficies sometidas a estudio (Frank y Koffi, 1990), el hisopado, el enjuague o el contacto directo con agar (Kumar y Anand, 1998).

Estos métodos, son herramientas indispensables para poder valorar la carga microbiana presente en las superficies o alimentos, los resultados logrados se pueden correlacionar con la eficacia de los procesos de higiene y otros aspectos de calidad (Fung, 2002). La evaluación de superficies se puede realizar mediante el uso de técnicas tradicionales de microbiología y el posterior uso de métodos de cultivo selectivos para el crecimiento de bacterias formadoras de biofilms (Maukonen et. al., 2003). Sin embargo, es necesario destacar que a día de hoy no existe metodología absolutamente eficaz para la realización de esta labor (Bari y Kawasaki, 2014).

La microscopía, es una de las herramientas que más información facilita sobre la morfología, filogenia y arquitectura de los biofilms. La microscopía de epifluorescencia directa (DEM), junto con el uso de agentes fluorescente como las tinciones LIVE/DEAD®, facilita la visualización de la estructura de los biofilms (Wirtanen y Mattila-Sandholm, 1993), permite enumerar los microorganismos que lo forman y evaluar su viabilidad (Montañez-Izquierdo et. al., 2011). También se utiliza la microscopia electrónica de barrido (SEM), que proporcionan información sobre la configuración y composición de la superficie del biofilm (Little et. al., 1991). La microscopía confocal de barrido (CLSM) también es muy utilizada (Notermans et. al., 1991; Zottola, 1991), permite la obtención de gráficos en 3 dimensiones de muestras gruesas (Chew y Yang, 2016).

También se utilizan técnicas de secuenciación de ADN que permiten, a partir del material genético extraído directamente del biofilm, evaluar la taxonomía, el contenido genómico y metabólico, de los microorganismos que conforman las comunidades de biofilms (Almeida et. al., 2011; Westermann et. al., 2012).

2.7 Métodos de control y erradicación de biofilms

Es esencial la limpieza y desinfección de las superficies en contacto con los alimentos, para evitar la adhesión de los microorganismos y prevenir la contaminación de los alimentos (Midelet y Carpentier, 2004). La aplicación de altas temperaturas durante la higienización de las superficies resulta ventajoso, ya que permite reducir la fuerza mecánica que se debe aplicar (Maukonen et. al., 2003). Los procesos de limpieza se deben realizar con el objetivo de romper la matriz extracelular de los biofilms, para que los biocidas puedan penetrar en los microorganismos (Simões et. al., 2006). La limpieza solo permite la eliminación de cerca del 90% de las bacterias y no reduce su viabilidad, tras los procesos de higiene estas células pueden asentarse en nuevas superficies y volver a generar biofilms (Gram et. al., 2007). Durante la desinfección se utilizan agentes antimicrobianos, tales como el cloro, el peróxido de hidrógeno, el yodo, el ozono o el ácido peracético (Chimielewski y Frank, 2007).

La metodología de higienización aplicada en la actualidad sobre superficies en contacto con alimentos, no es suficiente para controlar íntegramente la formación de biofilms por parte de *L. monocytogenes* (Carlton et. al., 2005), son necesarias mejores técnicas. Los bacteriófagos se han utilizado en diferentes sectores de la industria alimentaria para controlar la acción de microorganismos patógenos y proteger la calidad de los alimentos (Carlton et. al., 2005). En 2011, Montañez-Izquierdo y colaboradores estudiaron la acción del bacteriófago P100 sobre biofilms generados por *L. monocytogenes* en acero inoxidable y a temperatura ambiente. Obtuvieron cierta disgregación de las células adheridas, aunque la efectividad era dependiente de la concentración de bacteriófagos aplicada.

En la industria alimentaria, la acumulación de restos orgánicos promueve el desarrollo de microorganismos y la formación de biofilm (Srey et. al., 2012). El método más eficiente para controlar la formación de biofilms, es evitar la adhesión de las bacterias en las superficies (Chew y Yang, 2016).

2.8 Objetivos del trabajo

El objetivo general de este trabajo fue la determinación de la capacidad de formación de biofilms, por parte de diferentes cepas de *Listeria* spp. en diferentes condiciones ambientales.

Para ello, los objetivos específicos fueron:

- La evaluación del tiempo necesario para la formación de biofilm por parte de *Listeria* spp., en condiciones estáticas y con renovación de medio de cultivo.

- La comparación de la capacidad para formar biofilms por parte de distintas cepas de *Listeria monocytogenes* sobre acero inoxidable tratado o no, con un recubrimiento proteico, bajo distintas condiciones de temperatura.
- La valoración de la eficacia de los métodos de microscopía de epifluorescencia directa DEM y de cultivo por TEMPO, como herramientas para el recuento de células presentes en un biofilm.

3. Materiales y métodos

3.1 Superficies

Para la realización de los distintos ensayos se utilizaron discos de acero inoxidable 316, de 2 centímetros de diámetro y 1 milímetro de grosor. Dichos discos fueron sometidos a un proceso de limpieza y desinfección. En primer lugar, se les realizó una limpieza con detergente no bactericida (Lavavajillas Manual Ge³, ADIS Higiene, Spain) y tras 3 lavados de 10 segundos con agua destilada, se sumergieron los discos en iso-propanol al 70% (2-propanol Reag.Ph.Eur, Panreac, Panreac Química S.L.U, Castellar del Vallès, Barcelona, Spain) durante 15 minutos y fueron secados en cámara de flujo laminar, tal y como indica la normativa europea UNE-EN 13697 (AENOR, 2002) referente a ensayos en superficies no porosas. Además, con el objetivo de asegurar la esterilidad completa de los discos, éstos fueron autoclavados, en bolsas termosoldables, durante 15 minutos a 121°C, antes de empezar los ensayos.

3.2 Recuperación de cepas liofilizadas

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Listeria innocua* CECT 910, *Listeria monocytogenes* CECT 5672 y *Listeria monocytogenes* CDL 69, seleccionadas por ser las cepas que mayor producción de biofilm generaron, según estudios previos (datos no mostrados). Las distintas cepas fueron obtenidas a partir de cultivos liofilizados, de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y del Instituto Nacional de Investigación y tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

Se realizó una recuperación de las cepas liofilizadas hasta que los cultivos alcanzaron su fase de crecimiento exponencial. Para ello, se realizó una suspensión del liofilizado en Trypcase Soy Broth – TSB-T (REF42100, bioMérieux Industry, France) y se dejó en incubación a 30°C durante 48 horas. Posteriormente, la suspensión fue sembrada por agotamiento en placas de Tryptic Soy Agar - TSA (CM0131, Oxoid, Spain) y cultivadas a 30°C durante 48 horas. Finalmente, las colonias aisladas de dichas placas fueron resembradas en estría en nuevas placas

de TSA e incubadas a 37°C durante 24 horas, obteniendo así un cultivo puro de las cepas seleccionadas.

3.3 Desarrollo de los ensayos de *L. innocua*

3.3.1 Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo, se sembraron distintas colonias de la placa de TSA en 9 mL de TSB-T hasta alcanzar una turbidez de 0.0 – 0.1 unidades McFarland. El cultivo fue diluido decimalmente en una solución salina de triptona (TSS; 1 g de triptona [Becton Dickinson and Co.] y 8.5 g de cloruro sódico [Panreac, Panreac Química S.L.U, Castellar del Vallès, Barcelona, Spain] por litro de agua destilada, ajustando a un pH de 7.0 ± 0.2) para obtener una suspensión bacteriana de ensayo (SBE). La concentración inicial de células de la SBE, fue determinada mediante el cultivo y análisis vía TEMPO de distintas diluciones decimales.

3.3.2 Formación del biofilm

Para la formación de biofilm se sembraron 50 µL de SBE en cada disco, dando lugar a una concentración inicial en superficie de 5.5 log (células/cm²). Los discos fueron ubicados en placas de Petri y posteriormente introducidos en una cámara húmeda, donde fueron mantenidos en condiciones de saturación de humedad para evitar el secado, e incubados a temperatura ambiente (20-24°C), con el objetivo final de permitir un crecimiento del biofilm en condiciones de humedad (Fuster-Valls et. al., 2008).

3.3.3 Tratamientos

Los discos fueron sometidos a distintos tiempos de incubación y la formación de biofilm se desarrolló en condiciones estáticas con renovación de medio de cultivo, para de este modo, determinar bajo qué circunstancias se obtiene una mayor formación de biofilm. Los distintos tiempos de incubación aplicados se detallan en la Tabla 1. Para cada condición se realizaron dos replicados. La renovación del medio de cultivo se realizó aplicando un lavado por duplicado sobre los discos con 3 mL de agua destilada estéril, añadiendo 50 µL de TSB-T y volviendo a dejar los discos bajo las condiciones de incubación establecidas.

Periodo de incubación inicial	Periodo de incubación post lavado
24 h	+ 0h
	+ 24h
	+ 48h
	+ 72h
48 h	+ 0h
	+ 24h
	+ 48h
	+ 24h + 24h
	+ 24h + 24h + 72h
	+ 24h + 24h + 72h + 24h
72 h	+ 0h
	+ 24h

Tabla 1: Tiempos de incubación empleados en los ensayos de *L. innocua*

3.4 Desarrollo de los ensayos de *L. monocytogenes*

3.4.1 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se sembraron distintas colonias de las placas de TSA en 10 mL de un medio de cultivo selectivo para *Listeria monocytogenes*, TSYEB (Tryptone Soy Yeast Extract Broth) suplementado con un 1% de glucosa y un 2% de cloruro de sodio (stsyEB) (Pan et al., 2010), hasta alcanzar una turbidez de 0.0 – 0.1 unidades McFarland. La concentración inicial de células, fue determinada mediante el cultivo y análisis vía TEMPO de distintas diluciones decimales y mediante la observación de las células con microscopía de epifluorescencia directa.

3.4.2 Formación del biofilm

Para la formación de biofilm, se sembraron 30 μ L del medio de cultivo inoculado por disco, obteniendo una concentración inicial en superficie de 5.1 log (células/cm²) para cada muestra. Igual que en los experimentos con *L. innocua*, los discos fueron ubicados en placas de Petri y posteriormente introducidos en cámaras húmedas, donde fueron mantenidos en condiciones de saturación de humedad.

Los discos fueron sometidos a condiciones estáticas, con renovación de medio de cultivo. A cada disco se le aplicaron lavados por duplicado con 3 mL de agua destilada estéril y renovación de medio, transcurridas 48 horas desde su inoculación. Después de realizar los lavados, los discos se dejaron 72 horas más en incubación. Transcurrido ese tiempo, se volvieron a lavar e incubar durante 24 horas. El proceso se repitió una vez más, dando lugar a un periodo de incubación total de una semana.

3.4.3 Tratamientos

Se aplicaron dos procedimientos distintos a las muestras. A la mitad de los discos estudiados se les añadieron 200 µL de una solución rica en proteína, que contenía un 5% de leche desnatada, un 0,5% de Tween 80 (Tween® 80 synthesis grade, Scharlab S.L, Spain) y una pastilla de PBS buffer en 200 ml de agua destilada y se dejaron a 37°C en la estufa durante dos horas con el objetivo de promover la adherencia de la proteína en la superficie. A continuación se retiró el exceso de solución aplicando 3 mL de agua destilada estéril sobre el disco. Finalmente se almacenaron los discos en refrigeración durante toda la noche, para ser inoculados al día siguiente. La otra mitad de los discos no fue tratada, para así poder comparar como se adherían mejor las células, con o sin recubrimiento proteico.

Las cepas fueron sometidas a distintas condiciones de temperatura de incubación: 30°C, temperatura ambiente (20-24°C) y temperatura de refrigeración (10-12°C).

3.5 Evaluación por DEM

Una de las técnicas más competentes para evaluar la formación de biofilms y la adhesión celular en superficies alimentarias, es la microscopía de epifluorescencia directa (Pontefract, 1991; Yuste, 2005). Por ello, tras el periodo de incubación las superficies fueron lavadas y teñidas con 5 µL de tinción LIVE/DEAD® BacLight™ kit (L13152; Molecular Probes Inc., Oregon, USA), que permite cuantificar y medir la viabilidad de las bacterias. Este kit está compuesto por dos ácidos nucleicos fluorescentes: SYTO®9 que marca, de color verde las células cuya membrana se encuentra intacta y el ioduro de propidio (PI), que penetra y tiñe de color rojo las células muertas o con su membrana dañada (Molecular Probes LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits Manual, 2004). La aplicación conjunta de los dos agentes fluorescentes, nos permite la observación simultánea de las células con membrana intacta (viables - verdes) y de las células dañadas o muertas (no viables – rojo) (Montañez-Izquierdo et. al., 2011).

Tras la aplicación de la tinción, las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente bajo condiciones de oscuridad total, durante un periodo de 15 minutos. Posteriormente, los discos fueron observados por DEM, usando el microscopio de epifluorescencia Olympus BX51/BX52 (Olympus, Tokyo, Japan). Este microscopio está equipado con una lámpara de mercurio de 100W (USH-103OL, Olympus) y conectado a una cámara digital DP73 de Olympus.

Los discos fueron observados con el objetivo de 20X, para así determinar la estructura del biofilm, la viabilidad de sus células y enumerar las bacterias totales que lo forman. Para la

cuantificación de células viables y no viables se tomaron 5 fotografías al azar por cada muestra. Las fotografías fueron tratadas para equiparar su contraste, con el procesador de imágenes de Olympus y posteriormente analizadas utilizando los sistemas automatizados que ofrece el software del microscopio (cellSens software, Olympus). Se obtuvo el área promedio de las células y la superficie ocupada por el biofilm en cada fotografía. El número total de células se obtuvo dividiendo la superficie media ocupada por el biofilm entre el área de las células y tras una serie de cálculos los resultados se expresaron como el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado.

3.6 Evaluación por TEMPO®

La evaluación vía TEMPO® es un método rápido y automatizado, basado en el recuento por la técnica del Número Más Probable (NMP), utilizado en microbiología para la enumeración de microorganismos como marcadores de calidad (Álvarez-Gurrea, 2015). El sistema utilizado, fabricado por los laboratorios bioMérieux, está compuesto por viales, tarjetas, una estación de rellenado (TEMPO® Filler IQI01626, bioMérieux S.A, France), una de preparación (TEMPO® Prep) y otra de lectura (TEMPO® Read IQIR01595, bioMérieux S.A, France).

Tras el periodo de incubación oportuno, los discos fueron lavados, secados e introducidos en botes de plástico de un solo uso de 25 mL, que contenían 8 ± 0.1 g de perlas estériles (BEAD-002-1K0, Labbox Labware S.L, Vilassar de Dalt, Barcelona, Spain) y 10 mL de neutralizante (1g de triptona, 8.5 g de cloruro sódico y 30 g de Tween 80, por litro de agua destilada). Los botes se agitaron en Vortex durante 1 minuto y 30 segundos, con el objetivo de recuperar las células adheridas a la superficie, mediante la fricción de las perlas sobre el biofilm formado.

Posteriormente, se realizaron una serie de diluciones decimales con el objetivo de reducir la carga microbiana del contenido del recipiente y poder obtener resultados interpretables por TEMPO®. A continuación los viales TEMPO® que contienen un indicador fluorescente, se llenaron con 3 mL de agua destilada estéril y 1 mL de la muestra problema y se agitaron brevemente para homogenizar su contenido.

Mediante el uso del dispensador “TEMPO® filler” el contenido de los viales se distribuyó en las tarjetas, compuestas por 16 pocillos que son rellenados por concentraciones cada vez más diluidas de la muestra. Seguidamente, la referencia de cada tarjeta y las condiciones de incubación, fueron introducidas en la base de datos mediante el uso de la estación de preparación “TEMPO® Prep”. Finalmente, las tarjetas se incubaron a 30°C durante 48 horas

y tras ese periodo, los resultados se obtuvieron mediante la estación de lectura “TEMPO® Read”.

Dada la validación internacional obtenida por este equipo (Bio12/35-05/13 AFNOR), para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, y las pruebas previas realizadas en el laboratorio, consideramos los resultados de TEMPO equivalentes al recuento tradicional en placa.

3.7 Evaluación por BioFinder®

Pasado el periodo de incubación, a dos discos de cada condición planteada se les aplicó BioFinder® (Itram® Higiene S.L), con la capacidad de revelar biofilms sobre superficies en contacto con alimentos. Sobre dichas muestras se aplicaron una o dos gotas del producto y pasados 30 segundos fueron examinadas. Con una reacción positiva, se forma un burbujeo de color blanco o anaranjado, derivado de la interacción del producto con las enzimas catalasa procedentes de las bacterias. Este suceso, nos indica que en la superficie reside una cantidad de microorganismos viables superior a 4 unidades logarítmicas. (Itram Higiene, 2015).

3.8 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos con cada metodología fueron transformados a unidades logarítmicas y se analizaron con el software estadístico R, se les realizaron tests “One Way ANOVA”, “Two Way ANOVA” y Tuckey tests, para observar posibles diferencias entre cada uno de los datos obtenidos. También se realizaron curvas de regresión polinómicas de segundo orden, para comparar los resultados obtenidos con los distintos métodos.

4. Resultados y discusión

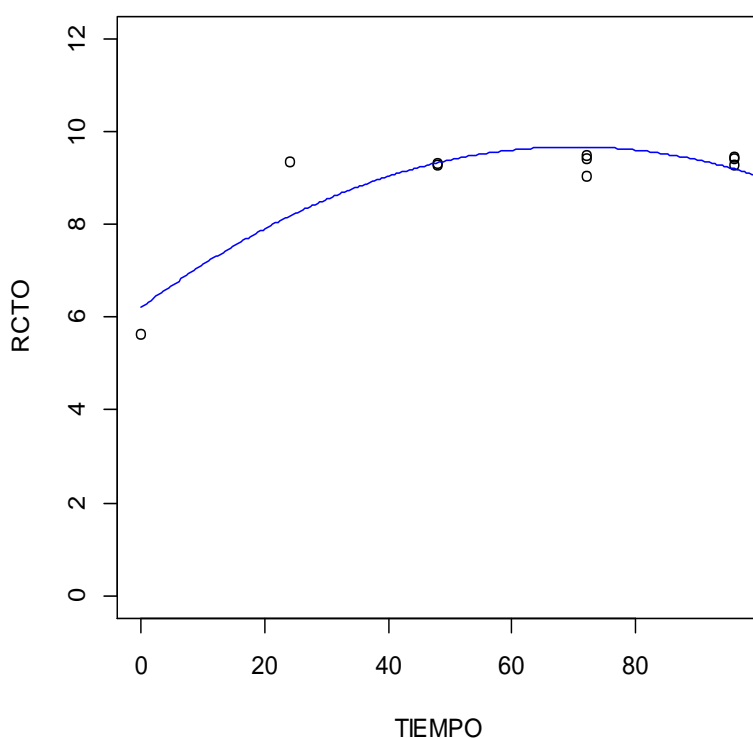
4.1 Formación de biofilms por *Listeria innocua*

4.1.1 Evaluación del tiempo óptimo de incubación para la formación de biofilms en superficies de acero inoxidable.

El objetivo principal de este ensayo fue evaluar el tiempo necesario para la formación de biofilms generados con *L. innocua*. Dado que parte del trabajo se tuvo que hacer sobre materiales de acero inoxidable con cierta exposición al ambiente y con posible contacto con el personal del laboratorio, se prefirió elegir una cepa no patógena clasificada de riesgo 1, a fin de evitar problemas de contaminación cruzada con patógenos, hacia el personal o el medioambiente. Con el método descrito, se procuraba seleccionar aquellas células que

quedaban adheridas a la superficie del disco tras los lavados, descartando todas aquellas que no tuvieran tal capacidad. Los resultados obtenidos se muestran en función del crecimiento y desarrollo del biofilm obtenido y de la viabilidad de las células que lo forman.

Los resultados obtenidos muestran un intenso crecimiento, pasando de 5.64 log (células/cm²) viables (valor inicial orientativo, obtenido por TEMPO) a 9.36 log (células/cm²) viables (valor obtenido por DEM) en las primeras 24 horas (Fig. 3). Posteriormente, se observa que el crecimiento de células viables se ajusta al crecimiento esperado a lo largo del tiempo ($R^2 = 0.8111$) ($p = 0.002929$), asumiendo un máximo crecimiento a las 72 horas, que corresponde a las observaciones realizadas a las 48 + 24h (9.48 log células viables /cm²). Una vez transcurridas las 72 horas de incubación se observa una estabilización de los niveles de contaminación ($p = 0.5619$).



$$y = -0.0007x^2 + 0.0988x + 6.2202$$

$$R^2 = 0.8111; p = 0.002929$$

Fig 3: Crecimiento en condiciones húmedas de *Listeria innocua* CECT 910 en discos de acero inoxidable a distintos tiempos de incubación ($n = 2$). El eje de las y representa el recuento en base logarítmica de las células observadas por DEM*

*Exceptuando el valor inicial a tiempo 0, que se obtuvo por TEMPO

La supervivencia de las células se midió mediante el recuento de las células viables y las no viables que forman el biofilm, con el fin de obtener la relación entre bacterias viables respecto bacterias totales. Se obtuvo un porcentaje de viables que oscilaba en torno al 99% y 95% en función del tiempo de incubación (Tabla. 2). El mayor porcentaje de células viables se observa a las 24 horas de incubación. A partir de ese tiempo el número de células dañadas aumenta y el porcentaje de supervivencia disminuye, aunque en ningún caso de manera significativa ($p = 0.2202$).

<i>Listeria innocua</i> CECT 910 (n = 2)			
Tiempo de incubación	Rto. viables	Rto. no viables	Supervivencia
24	9,37 ± 0,13	7,14 ± 0,48	99,31 ± 0,49
24 + 24	9,33 ± 0,06	7,09 ± 0,55	99,12 ± 0,94
24 + 48	9,43 ± 0,08	7,89 ± 0,06	97,16 ± 0,13
24 + 72	9,40 ± 0,02	7,95 ± 0,31	96,14 ± 2,63
48	9,28 ± 0,00	7,98 ± 0,10	95,18 ± 1,09
48 + 24	9,48 ± 0,01	7,54 ± 0,05	98,88 ± 0,11
48 + 48	9,28 ± 0,31	7,64 ± 0,04	97,46 ± 1,76
72	9,03 ± 0,57	8,04 ± 1,19	67,69 ± 44,86
72 + 24	9,47 ± 0,04	7,90 ± 0,33	96,94 ± 2,29
p	0,5619	0,0681	0,2202

Tabla 2: Recuento en base logarítmica obtenido por DEM de células viables, no viables y porcentaje de supervivencia de *Listeria innocua* CECT 910 sobre discos de acero inoxidable y a distintos tiempos de incubación. Valores estadísticos obtenidos tras aplicar el test estadístico “One Way Anova”.

La formación de biofilm se puede determinar en función de la organización de las células observada por DEM: una disposición de las células disgregada nos indica que el biofilm no se ha formado, mientras que cuando las células se empiezan a agregar y forman una red tridimensional, se puede suponer que se está empezando a establecer un biofilm con una estructura organizada e intacta (Chimielevski y Frank, 2003). Las imágenes tomadas por DEM (Fig. 4), permiten observar la disposición de las células en los discos y determinar el tiempo necesario para poder generar un biofilm maduro.

Pese a que no se pudo observar un biofilm bien desarrollado mediante la visualización de las muestras en DEM y no se observaron diferencias significativas respecto al crecimiento a distintos tiempos de incubación, se determinó que tras 48 horas, un lavado y 24 horas más de incubación, el biofilm empezaba a formarse. El aspecto general del biofilm no parecía tan disgregado como el obtenido en tiempos inferiores, ya que se observaron conglomerados de células y agrupaciones tridimensionales.

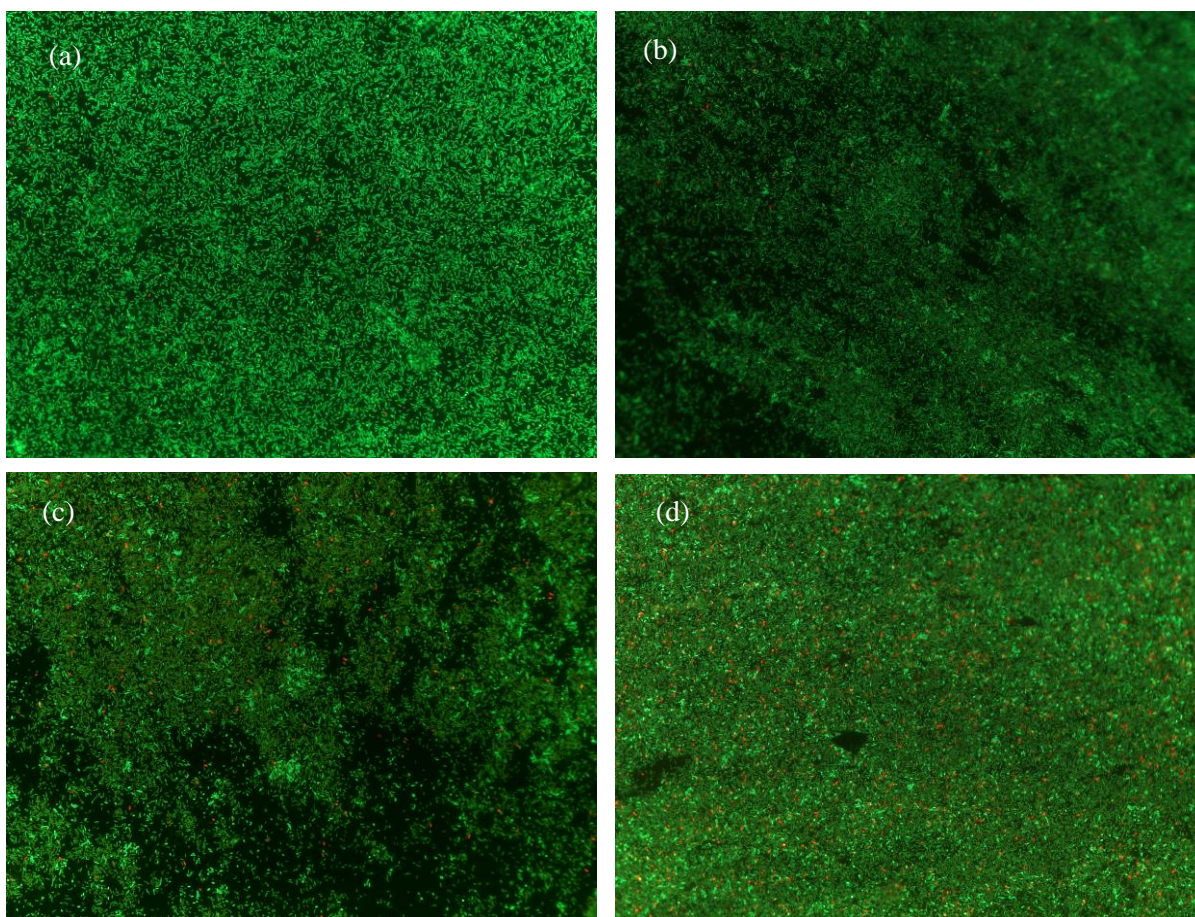


Fig 4: Imágenes tomadas con DEM a 20X, tras tinción con Live/Dead® de *Listeria innocua* CECT 910 a distintos tiempos de incubación, (a) 24 + 0 h, (b) 24 + 24 h, (c) 48 + 24 h, (d) 72 + 24 h.

Los resultados de crecimiento, supervivencia y las imágenes tomadas por DEM, revelaron que tras 48 + 24 horas de incubación se observó una clara estructura tridimensional, correspondiente a la formación de un biofilm en los discos de acero inoxidable. Tras 72 horas, un lavado y 24 horas más de incubación, también se observó una importante cantidad de células adheridas y agrupadas robustamente entre sí, pero se dio preferencia al periodo de incubación más corto; para facilitar la repetición de los ensayos.

Como nuestro objetivo era visualizar la formación de biofilm equivalente a una superficie industrial, durante una semana de trabajo. Se repitió el experimento sometiendo las muestras a un periodo de incubación inicial de 48 + 24 horas, aplicándoles diariamente lavados hasta alcanzar dicha semana de incubación.

4.1.2 Crecimiento de *L. innocua* con aplicación de lavados sucesivos

Los resultados vuelven a mostrar un importante aumento en el número de células, viables i no viables, adheridas a los discos tras el primer periodo de incubación (48 + 24 = 72 horas). Este crecimiento se ajusta a la función polinómica que representa el crecimiento esperado de los microorganismos a lo largo del tiempo ($R^2 = 0.9258$) (Tabla. 3) (Fig. 5), dónde se asume un máximo crecimiento tras una semana de incubación (48 + 24 + 24 + 72 horas) con 9.25 log (células viables /cm²), aunque los datos obtenidos no muestran diferencias significativas ($p = 0.4473$), el porcentaje de supervivencia fue el mayor (99,68%) y la desviación típica observada fue la menor de las estudiadas (0,021).

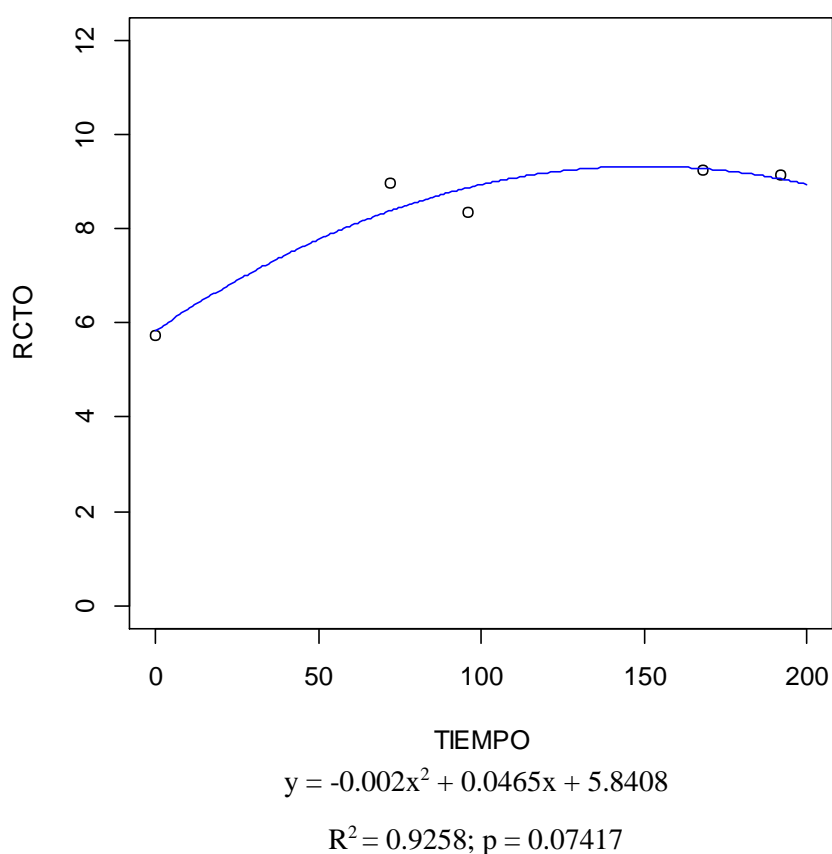


Fig 5: Crecimiento en condiciones húmedas de *Listeria innocua* CECT 910 en discos de acero inoxidable a distintos tiempos de incubación y tras la aplicación de lavados sucesivos (n = 2). El eje de las y representa el recuento en base logarítmica de las células observadas por DEM*.

*Exceptuando el valor inicial a tiempo 0, que se obtuvo por TEMPO

<i>Listeria innocua</i> CECT 910 (n = 2)			
Tiempo de incubación	Rto. viables	Rto. no viables	Supervivencia
48 + 24	8,97 ± 0,43	8,35 ± 0,42	72,91 ± 30,34
48 + 24 + 24	8,35 ± 0,96	8,12 ± 0,16	59,13 ± 38,51
48 + 24 + 24 + 72	9,26 ± 0,02	6,76 ± 0,05	99,68 ± 0,021
48 + 24 + 24 + 72 + 24	9,15 ± 0,12	7,83 ± 0,74	91,18 ± 10,83
p	0,4473	0,23	0,2647

Tabla 3: Recuento en base logarítmica obtenido por DEM de células viables, no viables y porcentaje de supervivencia de *Listeria innocua* CECT 910 sobre discos de acero inoxidable y a distintos tiempos de incubación, tras la aplicación de lavados sucesivos. Valores estadísticos obtenidos tras aplicar el test estadístico “One Way Anova”.

Estos resultados se corresponden con las imágenes digitales obtenidas por DEM (Fig. 6), que muestran que el biofilm más maduro y con mayor cantidad de agregaciones es el obtenido tras una semana de incubación

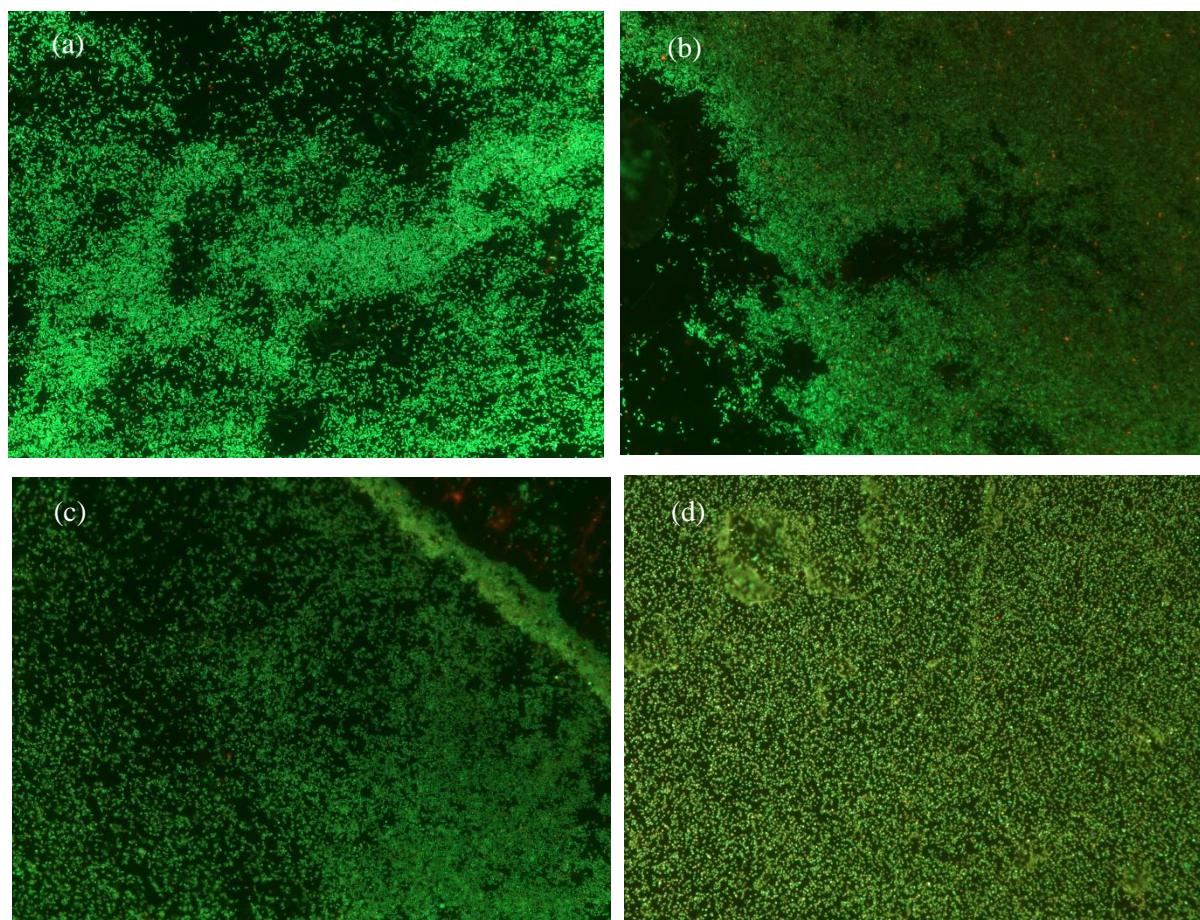


Fig 6: Imágenes tomadas con DEM a 20X, tras tinción con Live/Dead® de *Listeria innocua* CECT 910 a distintos tiempos de incubación, (a) 48 + 24 h, (b) 48 + 24 + 24 h, (c) 48 + 24 + 24 + 72 h, (d) 48 + 24 + 24 + 72 + 24 h.

Como se ha podido comprobar, sobre superficies de acero inoxidable, *Listeria innocua* es un microorganismo capaz de formar biofilms, formados por elevadas cantidades de células, en poco tiempo. Diversos estudios demuestran que *Listeria innocua* tiene una mayor permanencia sobre superficies de la industria alimentaria que *Listeria monocytogenes* (Aguado et. al., 2004; Thimothe et. al., 2004). Estas dos bacterias son genéticamente muy cercanas, por lo que suelen competir por los mismos hábitats y recursos (Norwood y Gilmour, 2001; Milillo et. al., 2012). Entender las relaciones de competencia que se dan entre estos dos microorganismos resulta importante ya que la detección *L. innocua* en los alimentos puede producir falsos positivos para *L. monocytogenes* (Koo et. al., 2011).

Cuando estas dos bacterias se desarrollan conjuntamente, *L. innocua* ha demostrado ser la que mayor capacidad de adherencia y formación de biofilm presenta (Koo et. al., 2014), debido a que poseen una superficie celular más electronegativa que favorece la adhesión inicial de las células (Meylheuc et. al., 2002) y a su mayor eficiencia en la utilización de recursos (Zitz et. al., 2011). Sin embargo, cuando su crecimiento se da por separado, las dos especies tienden a comportarse de manera similar, presentando valores de formación de biofilm muy similares (Koo et. al., 2014). Por este motivo se siguió el patrón de crecimiento obtenido con *L. innocua* para los siguientes experimentos con *L. monocytogenes*.

4.2 Formación de biofilms por *Listeria monocytogenes*

4.2.1 Crecimiento de L. monocytogenes bajo distintas condiciones de incubación

El objetivo principal de este ensayo fue evaluar si diferentes condiciones de incubación, influían de manera significativa en el crecimiento y generación de biofilms por parte de dos cepas de *L. monocytogenes*. Se inocularon $5.38 \pm 0.32 \log$ (células/cm²) totales de *L. monocytogenes* CECT 5672 y $5.24 \pm 0.29 \log$ (células/cm²) totales de *L. monocytogenes* CDL 69 sobre distintos discos de acero inoxidable, recubiertos o no con una solución proteica. Posteriormente, se incubaron los discos durante toda una semana, a temperatura ambiente, 30°C y 10°C y se fueron aplicando lavados durante diferentes periodos. Los resultados se obtuvieron mediante distintas metodologías mencionadas.

4.2.1.1 Evaluación por DEM

Los resultados obtenidos por DEM (Tabla. 4), no muestran diferencias significativas respecto a la variable tratamiento. Los valores alcanzados, para los discos recubiertos y los no recubiertos, no difieren estadísticamente en ninguna de las dos cepas bacterianas estudiadas, *L. monocytogenes* CECT 5672 ($p = 0.705$) y *L. monocytogenes* CDL 69 ($p = 0.611$), ni a ninguna de las temperaturas de incubación.

Algunos autores, consideran que la exposición de los microorganismos a largos periodos de inanición incrementa su adherencia a las superficies (Brown et. al., 1977). Estos biofilms están formados por residuos orgánicos, sustancias poliméricas extracelulares, proteínas y fosfato cálcico (Flint et. al., 1997; Mittelman, 1998), por lo que algunos autores consideran que los restos orgánicos pueden establecer depósitos y favorecer el desarrollo de los microorganismos (Simões, 2010). La formación de biofilms en la industria alimentaria puede provocar importantes problemas de higiene e importantes pérdidas económicas (Bremer et. al., 2006; Gram et. al., 2007).

Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el recubrimiento de los discos, con una solución rica en proteína, no modifica en ningún sentido la adherencia de las bacterias a la superficie. Esto pudo deberse a que la cantidad de proteína añadida fuera insuficiente, como para observar diferencias entre los discos recubiertos y no recubiertos. O bien, a que *L. monocytogenes* alcanzó su fase estacionaria de crecimiento en ambas condiciones estudiadas.

En cambio, si existen diferencias significativas respecto a la variable temperatura. Los resultados obtenidos para *L. monocytogenes* CECT 5672, muestran un crecimiento

significativamente inferior a 10°C respecto al obtenido a temperatura ambiente, tanto para los discos recubiertos ($p = 0.0006$), como para los no recubiertos ($p = 0.0003$). El crecimiento a 30°C también difiere del obtenido a 10°C. En cambio, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos a temperatura ambiente respecto a los obtenidos a 30°C, ni en discos recubiertos ($p = 0.99$), ni en no recubiertos ($p = 0.41$). Con *L. monocytogenes* CDL 69 se observaron resultados similares, un significativo menor desarrollo a 10°C respecto al obtenido a temperatura ambiente y a 30°C, tanto para los discos recubiertos ($p = 0.001$) ($p = 0.002$), como para los no recubiertos ($p = 0.001$) ($p = 0.002$).

Pese a que *L. monocytogenes* es considerada como un patógeno psicrotrofo, con capacidad para crecer y desarrollarse a temperaturas de refrigeración (Schöbitz et. al., 2009), los resultados nos indican que bajo las condiciones planteadas, el crecimiento a 10°C fue mucho más reducido que en el resto de temperaturas estudiadas. Las EPS juegan un papel fundamental en la adhesión de las bacterias a las superficies (Fletcher, 1980), *L. monocytogenes* sólo es capaz de generar EPS bajo determinadas temperaturas, que oscilan entre los 18 y 21°C (Herald y Zottola, 1988), motivo que podría explicar los valores bajos de crecimiento obtenidos a 10°C. Se entiende entonces, que para evitar la proliferación de microorganismos patógenos, en la industria alimentaria los productos se procesen y almacenen a bajas temperaturas, (Norwood y Gilmour, 2001).

(a) <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 5672 DEM (n = 2)			
Tratamiento	T ^a Amb	30°C	10°C
Recubierto	9,02 ± 0,22 ^a	8,92 ± 0,07 ^b	6,59 ± 0,33 ^{a,b}
No recubierto	9,21 ± 0,04 ^c	8,69 ± 0,44 ^d	6,45 ± 0,17 ^{c,d}

(b) <i>Listeria monocytogenes</i> CDL 69 DEM (n = 2)			
Tratamiento	T ^a Amb	30°C	10°C
Recubierto	9,18 ± 0,16 ^e	9,02 ± 0,22 ^f	7,41 ± 0,68 ^{e,f}
No recubierto	9,32 ± 0,20 ^g	9,24 ± 0,09 ^h	6,76 ± 0,21 ^{g,h}

Tabla 4: Recuento expresado en base logarítmica de las células totales observadas por DEM, de (a) *L. monocytogenes* CECT 5672 y (b) *L. monocytogenes* CDL 69 sobre discos de acero inoxidable, con la aplicación de distintos tratamientos y temperaturas de incubación (n = 2). Valores estadísticos obtenidos tras aplicar el test estadístico “Two Way Anova”.

Los resultados con las mismas letras presentan diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$)

En las siguientes imágenes (Fig. 7) (Fig. 8), se puede observar la cantidad total de células adheridas bajo las distintas condiciones. Se puede observar un mayor número de células a temperatura ambiente y a 30°C, siendo el recuento a 10°C el más bajo.

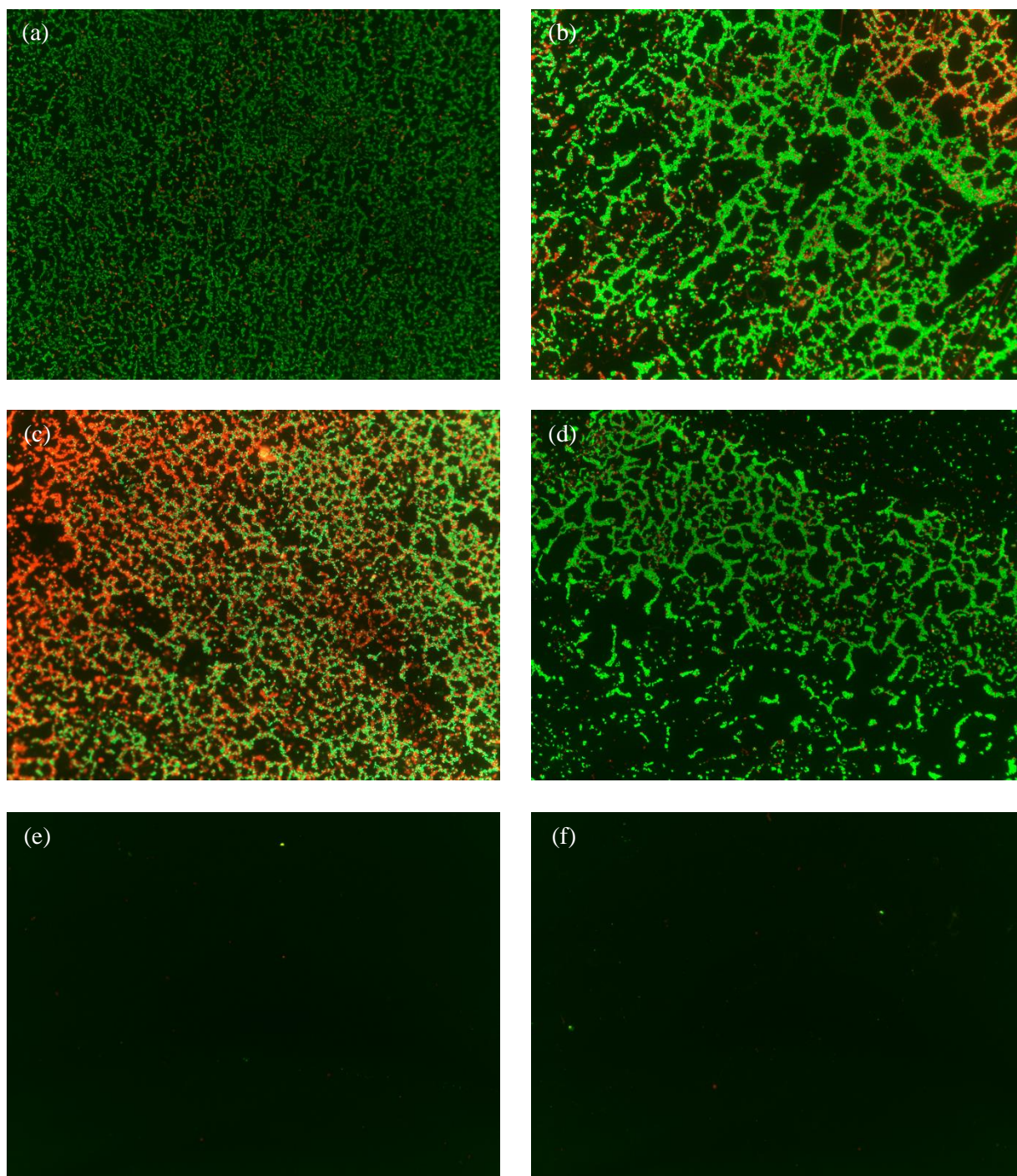


Fig 7: Imágenes tomadas con DEM a 20X, tras tinción con Live/Dead® de *Listeria monocytogenes* CECT 5672 a distintas condiciones de incubación, (a) Tª ambiente – No recubierto, (b) Tª ambiente – Recubierto, (c) 30°C – No recubierto, (d) 30°C – Recubierto, (e) 10°C – No recubierto, (f) 10°C – Recubierto

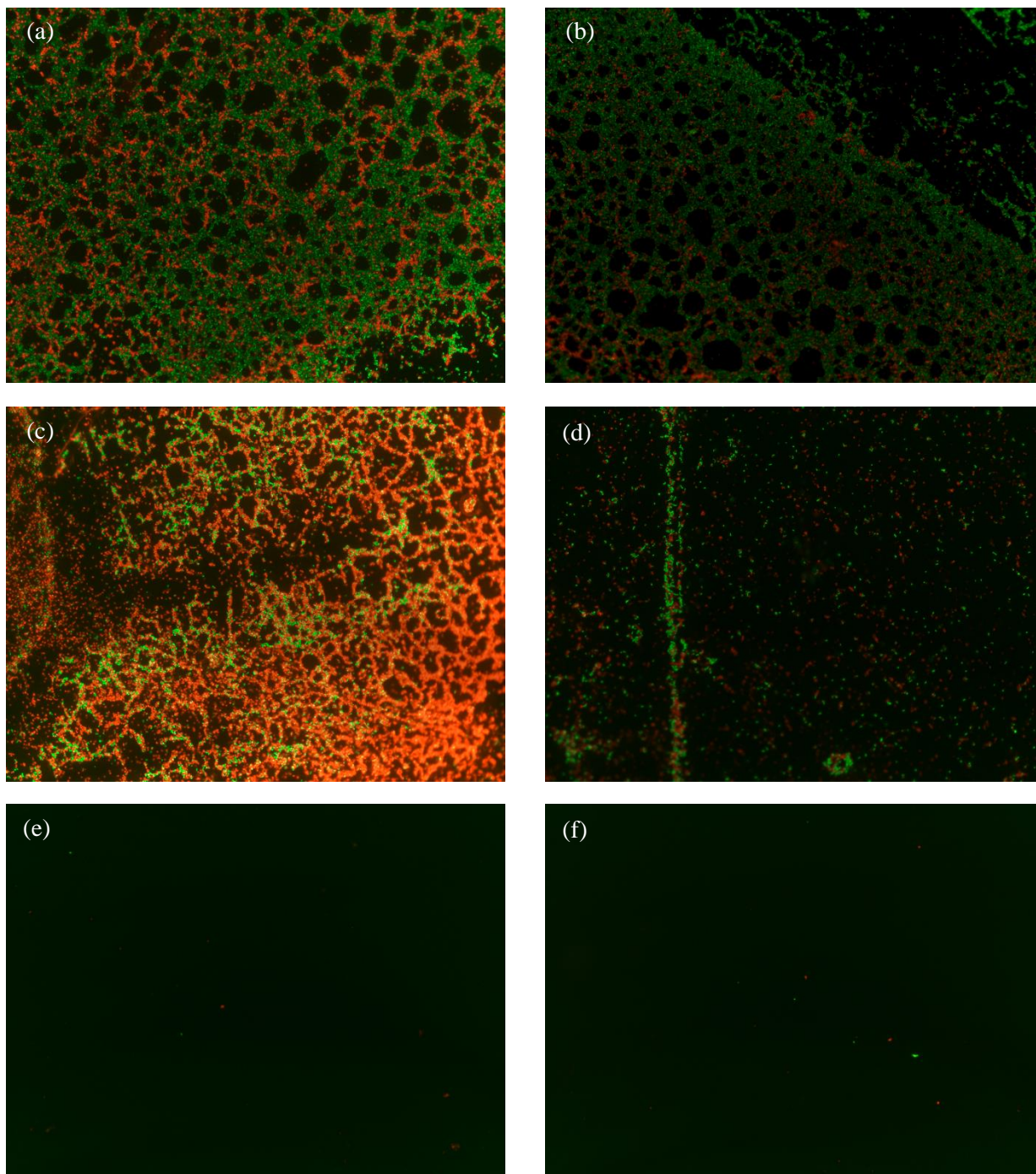


Fig 8: Imágenes tomadas con DEM a 20X, tras tinción con Live/Dead® de *Listeria monocytogenes* CDL 69 a distintas condiciones de incubación, (a) Tª ambiente – No recubierto, (b) Tª ambiente – Recubierto, (c) 30°C – No recubierto, (d) 30°C – Recubierto, (e) 10°C – No recubierto, (f) 10°C – Recubierto.

Las imágenes obtenidas se corresponden con los datos anteriores, en ellas se observa una mayor cantidad de células adheridas a los discos en las fotografías tomadas a las muestras cultivadas a temperatura ambiente y 30°C.

4.2.1.2 Evaluación por Biofinder

También se evaluó la cantidad de microorganismos presentes sobre los discos mediante el uso del método rápido de análisis Biofinder®. Como se puede observar en la Fig. 9, una reacción positiva a este producto crea una espuma sobre la superficie, mientras una reacción negativa no crea burbujeo. Los datos obtenidos se pueden observar en la Tabla 5 y están en consonancia con los obtenidos por DEM. Aparece espuma en los discos cultivados a temperatura ambiente y 30°C, mientras que no aparece en los cultivados a 10°C. Esto nos indica que en estos últimos discos no hay una cantidad de microorganismos mayor a 4 unidades logarítmicas o que las células que se encuentran no son viables.

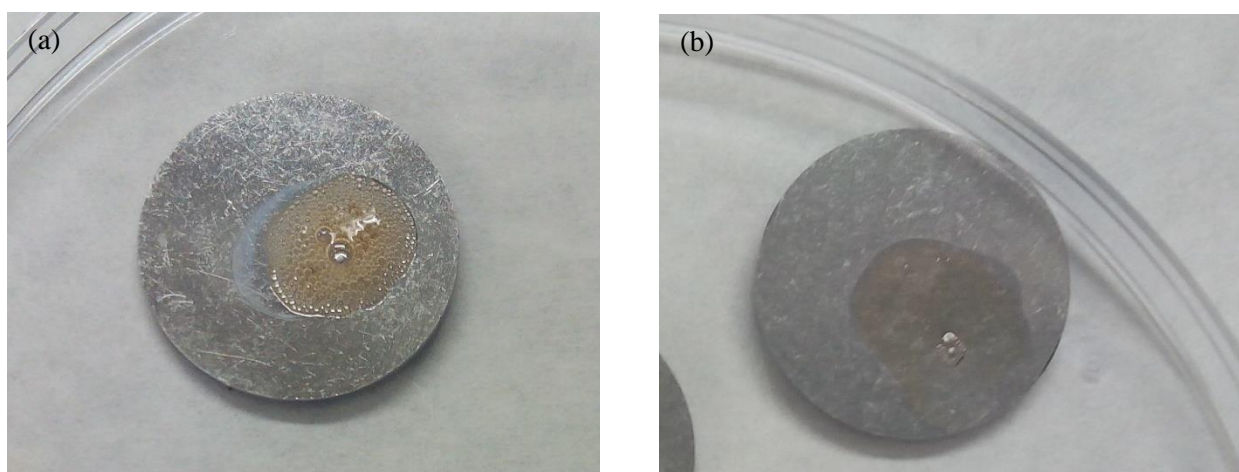


Fig 9: Imágenes de discos tratados con Biofinder®. (a) Reacción positiva. (b) Reacción negativa

Análisis con Biofinder®				
Cepa	Tratamiento	Tª Amb	30°C	10°C
<i>L. monocytogenes</i> CECT 5672	Recubierto	++	+	-
	No recubierto	++	+	-
<i>L. monocytogenes</i> CDL 69	Recubierto	++	+	-
	No recubierto	++	+	-

Tabla 5: Resultados de los análisis con Biofinder® en las cepas de *L. monocytogenes* CECT 5672 y *L. monocytogenes* CDL 69 cultivadas sobre discos de acero inoxidable y con la aplicación de distintos tratamientos y temperaturas de incubación.

4.2.2 Comparación del recuento obtenido por microbiología tradicional y por análisis de imágenes.

El recuento del número de células que forman los biofilms de *L. monocytogenes* fue obtenido mediante la observación por DEM y por TEMPO. El objetivo radicaba en comparar los resultados obtenidos con estos dos métodos y así comprobar la eficacia del procedimiento de agitación y raspado con perlas, realizado previamente al cultivo i recuento por TEMPO, para recuperar las células adheridas a los discos. Estos análisis se realizaron a distintas temperaturas de incubación y con el recubrimiento previo o no, de los discos con una solución rica en proteínas.

La correlación obtenida entre los dos métodos no fue significativa para ninguna de las cepas estudiadas, ni a temperatura ambiente (Fig. 10), ni a 30°C (Fig. 11). A temperatura ambiente se obtuvo una baja relación entre los dos métodos estudiados, tanto para *L. monocytogenes* CECT 5672 ($R^2 = 0.2631$; $p = 0.4001$), como para *L. monocytogenes* CDL 69 ($R^2 = 0.3348$; $p = 0.2401$). Esto indica que la cantidad de bacterias extraídas para la evaluación por TEMPO es siempre similar, es decir, no porque haya más bacterias en el disco se extraerán más. También hay que tener en consideración que, cuando los microorganismos están sujetos a condiciones adversas, como el secado, la correlación puede verse afectada, ya que pueden aparecer un número significativo de células dañadas (Fuster-Valls et. al., 2008).

(a) *L. monocytogenes* CECT 5672 – Tª Ambiente (b) *L. monocytogenes* CDL 69 – Tª Ambiente

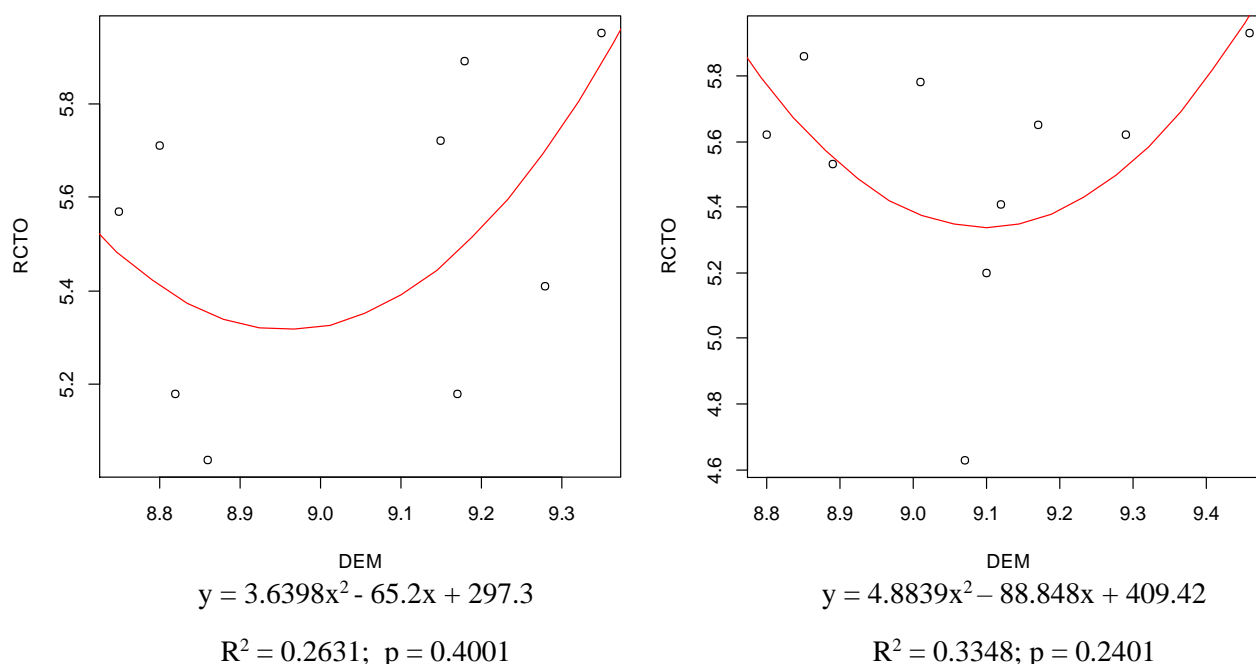


Fig 10: Comparación de los resultados obtenidos por DEM y por TEMPO a temperatura ambiente, mediante regresión polinómica de segundo orden. para (a) *L. monocytogenes* CECT 5672 v (b) *L. monocytogenes* CDL 69. (n=5)

En cambio a 30°C, pese a que la correlación sigue sin ser significativa, su ajuste aumenta en ambas cepas; *L. monocytogenes* CECT 5672 ($R^2 = 0.8425$; $p = 0.3968$), *L. monocytogenes* CDL 69 ($R^2 = 0.8393$; $p = 0.4009$), debido a la baja cantidad de puntos obtenidos para estas condiciones.

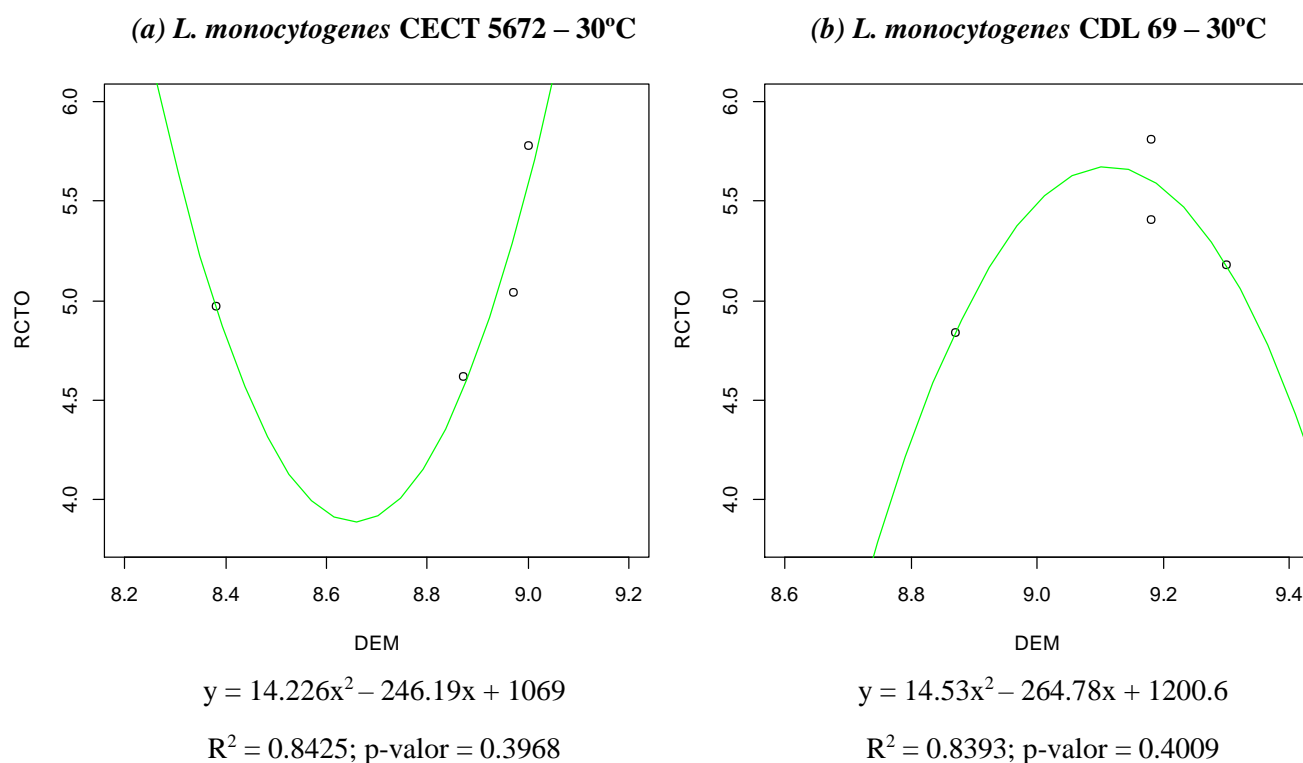


Fig 11: Comparación de los resultados obtenidos por DEM y por TEMPO a 30°, mediante regresión polinómica de segundo orden, para (a) *L. monocytogenes* CECT 5672 y (b) *L. monocytogenes* CDL 69. (n=2).

Se observaron diferencias significativas en el número de células detectadas con los distintos métodos, a todas las condiciones y temperaturas sometidas a estudio (Tabla. 6), (Tabla. 7). Los recuentos obtenidos por DEM fueron 3-4 unidades logarítmicas superiores a los obtenidos con TEMPO, lo que indica que la cantidad de células que se extraen del disco tras un proceso de agitación con perlas y posterior cultivo vía TEMPO, es significativamente inferior ($p < 0.05$) a los valores reales observados con el microscopio.

Estos resultados demuestran que con el método utilizado no se rompe suficientemente el EPS formado por los microorganismos. Al aplicar las perlas, quedan bacterias adheridas al disco que no son detectadas por TEMPO, motivo por el cual se obtienen valores más elevados realizando el recuento por microscopía. Si tras realizar múltiples réplicas, existiera una correlación entre los resultados obtenidos por DEM y por TEMPO, se podría establecer un factor de corrección que permitiera dar a conocer la carga microbiana real de una superficie, tras analizarla por

recuento microbiológico. Se podrían estudiar otras alternativas para desprender totalmente el biofilm, como la aplicación de una solución enzimática sobre los discos de acero inoxidable antes de cultivar las células.

T ^a Ambiente (n = 5)				
Cepa	Tratamiento	Rto DEM	Rto TEMPO	p
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 5672	Recubierto	8,97 ± 0,24	5,38 ± 0,27	1,8E-11
	No recubierto	9,15 ± 0,20	5,69 ± 0,35	1,2E-11
<i>Listeria monocytogenes</i> CDL 69	Recubierto	9,01 ± 0,19	5,44 ± 0,46	1,9E-11
	No recubierto	9,14 ± 0,22	5,61 ± 0,30	3,4E-11

Tabla 6: Recuento obtenido por DEM y por TEMPO a temperatura ambiente, para *L. monocytogenes* CECT 5672 y *L. monocytogenes* CDL 69. (n=5).

30°C (n = 2)				
Cepa	Tratamiento	Rto DEM	Rto TEMPO	p
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 5672	Recubierto	8,92 ± 0,07	4,83 ± 0,30	1,24E-04
	No recubierto	8,69 ± 0,44	5,38 ± 0,57	4,72E-04
<i>Listeria monocytogenes</i> CDL 69	Recubierto	9,02 ± 0,22	5,33 ± 0,69	2,19E-04
	No recubierto	9,24 ± 0,09	5,30 ± 0,17	1,76E-04

Tabla 7: Recuento obtenido por DEM y por TEMPO a 30°C, para *L. monocytogenes* CECT 5672 y *L. monocytogenes* CDL 69. (n=2).

Sin embargo este método tiene limitaciones, ya que existe un umbral de detección. Los resultados obtenidos para los biofilms generados a 10°C (Tabla. 8), indican que a bajas temperaturas, el recuento microbiano por TEMPO no funciona. Cuando el recuento por microscopía es igual o inferior a 7-7.5 unidades logarítmicas, no se obtienen resultados mediante el método de recuperación de bacterias por agitación con perlas y posterior cultivo.

10°C (n = 3)				
Cepa	Tratamiento	Rto DEM	Rto TEMPO	p
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 5672	Recubierto	7,00 ± 0,76	0 ± 0	3,00E-07
	No recubierto	6,46 ± 0,13	0 ± 0	9,41E-09
<i>Listeria monocytogenes</i> CDL 69	Recubierto	7,36 ± 0,49	0 ± 0	2,00E-07
	No recubierto	7,04 ± 0,50	0 ± 0	5,82E-09

Tabla 8: Recuento obtenido por DEM y por TEMPO a 10°C, para *L. monocytogenes* CECT 5672 y *L. monocytogenes* CDL 69. (n=3).

Además, a esta temperatura los resultados obtenidos con Biofinder® fueron negativos, por lo que la mayor parte de la carga microbiana presente en los discos se encontraba dañada o muerta. Este, también puede ser el motivo por el que no se recuperaron microorganismos a 10°C. En futuras investigaciones se planteará estudiar cómo se generan los biofilms de *L. monocytogenes* a esta temperatura, alargando el período de incubación y consecuente lavado de los discos.

El procedimiento utilizado para recuperar las bacterias causándoles el menor daño posible, ha estado en discusión durante años (Frank y Koffi, 1990; Mafu, 1990; Kim y Frank, 1994; Oh y Marshall, 1995; Hood y Zottola, 1997). Mientras que con otros métodos solo se recuperan células no adheridas, con el método aplicado se pretende remover las células adheridas a la superficie de los discos.

Al realizar la extracción de microorganismos de una superficie, se debe elegir un modelo de recuperación que garantice la mayor recuperación de bacterias, para no tener lecturas falsas y poder minimizar la variabilidad de los ensayos. El modelo de recuperación por agitación con perlas hace que, estas perlas choquen contra la superficie causando fricción, lo que trae como consecuencia el desprendimiento y rotura de los biofilms, derivando en un recuento real de la carga microbiana (Montañez-Izquierdo, et. al., 2011).

Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de recuperación de cada cepa (Tabla. 9), (Tabla. 10), (Tabla. 11). Este porcentaje, nos señala la cantidad de células que quedan pegadas al disco, es decir, el número de microorganismos que no se recuperan tras la agitación con perlas. De esta manera se pretendía determinar la eficacia del método y comprobar, sobre cuál de las condiciones planteadas se daba una mayor recuperación.

Recuperación - Tª Ambiente (n = 5)		
Cepa	Tratamiento	Recuperación
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 5672	Recubierto	60,04 ± 3,94
	No recubierto	61,69 ± 3,58
<i>Listeria monocytogenes</i> CDL 69	Recubierto	59,50 ± 5,39
	No recubierto	61,43 ± 3,42

Tabla 9: Porcentaje de recuperación a temperatura ambiente, para *L. monocytogenes* CECT 5672 y *L. monocytogenes* CDL 69. (n=5).

Recuperación - 30°C (n = 2)		
Cepa	Tratamiento	Recuperación
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 5672	Recubierto	54,19 ± 2,89
	No recubierto	61,79 ± 3,42
<i>Listeria monocytogenes</i> CDL 69	Recubierto	58,95 ± 6,23
	No recubierto	57,35 ± 2,35

Tabla 10: Porcentaje de recuperación a 30°C, para *L. monocytogenes* CECT 5672 y *L. monocytogenes* CDL 69. (n=2).

Recuperación - 10° C (n = 3)		
Cepa	Tratamiento	Recuperación
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 5672	Recubierto	0,0 ± 0,0
	No recubierto	0,0 ± 0,0
<i>Listeria monocytogenes</i> CDL 69	Recubierto	0,0 ± 0,0
	No recubierto	0,0 ± 0,0

Tabla 11: Porcentaje de recuperación a 10°C, para *L. monocytogenes* CECT 5672 y *L. monocytogenes* CDL 69. (n=3).

A temperatura ambiente, no se encontraron diferencias significativas respecto a la recuperación obtenida entre discos recubiertos y no recubiertos ($p = 0.5010$), ni entre cepas ($p = 0.9455$). Respecto a la recuperación obtenida a 30°C, tampoco existen diferencias significativas en relación al tratamiento ($p = 0.6639$), ni cepa ($p = 0.9980$). Esto indica que ninguna de estas variables está influyendo en la recuperación de los microorganismos adheridos.

Anteriores estudios, han demostrado que las cepas más virulentas, que mayor número de casos de listeriosis provocan, son las que presentan una mayor adherencia en superficies de acero inoxidable (Norwood y Gilmour, 1999). Las cepas con las que se realizaron los experimentos, no mostraron diferencias significativas entre sí, por lo que se deduce que podría tratarse de cepas muy parecidas genéticamente.

La expresión de proteínas propias, como las porinas, por parte de las células que conforman los biofilms, ayudan a mejorar la adherencia y el transporte extracelular, de estas estructuras (Garrett et. al., 2008). Sin embargo los resultados obtenidos, indican que la solución proteica aplicada sobre los discos no es un factor que intervenga en la adherencia de las células, ya que se despegó una proporción similar de células en los discos tratados, como en los no tratados.

5. Conclusiones

1. Este estudio demuestra, que sobre acero inoxidable, *Listeria spp.* necesita unas condiciones específicas de incubación y se demora una semana en generar biofilms bien establecidos. La curva de crecimiento es exponencial durante los primeros días y posteriormente, el crecimiento se estabiliza entorno a las 9 unidades logarítmicas. Es entonces cuando se empiezan a formar agrupaciones e interconexiones, entre las distintas bacterias que forman el biofilm.
2. El crecimiento de *L. monocytogenes* es diferente, en función de las distintas temperaturas de incubación estudiadas. Tras una semana a 10°C, este microorganismo no es capaz de formar biofilms y presenta unas tasas de crecimiento bajas. En cambio, la incubación a temperatura ambiente y a 30°C permiten un gran crecimiento del microorganismo y el establecimiento de biofilms, bien formados, sobre la superficie.
3. Se ha observado, que el tratamiento previo de los discos de acero inoxidable con un recubrimiento proteico, no influye en una mayor adherencia, ni mayor crecimiento de las células. También se observó que no existen diferencias significativas respecto al crecimiento de las dos cepas de *L. monocytogenes* estudiadas.
4. Los datos obtenidos con las distintas metodologías de recuento, DEM y TEMPO, no correlacionan entre sí. Esto es debido, posiblemente, a la exposición de los discos a condiciones adversas, previo a su observación por microscopía o bien a que los niveles de contaminación en el biofilm formado, no presentaban diferencias significativas entre sí, por lo que no hay una evolución de recuentos, sino un nivel de contaminación máximo. En consecuencia, la recuperación, previa al recuento por TEMPO, siempre fue constante, e inferior en unos 4 logs a los recuentos por DEM.
5. Con la metodología aplicada en este estudio, sólo se recupera una parte del biofilm adherido a la superficie, por lo que el recuento obtenido por microbiología tradicional es inferior al real. Esto quiere decir, que la detección de niveles bajos de *L. monocytogenes* por recuento tradicional, supone una elevada carga microbiana real en superficie. Los biofilms compuestos por un máximo de 7 unidades logarítmicas de

células totales, no son detectados con este método rápido, debido a que a bajas temperaturas, la adherencia observada era nula y a que una gran proporción de células estaban dañadas o muertas

6. Es importante continuar con este estudio, para mejorar los sistemas de extracción y poder correlacionar los niveles de contaminación real en biofilms con los resultados analíticos a escala de laboratorio

6. Bibliografía

- Adetunji, V. O., & Isola, T. O. (2011). Crystal Violet Binding Assay for Assessment of Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp* on Wood, Steel and Glass Surfaces. *Global Veterinaria*, 6(1), 6–10.
- AENOR. (2002). Norma UNE-EN 13697:2002. <http://www.aenor.es/>.
- Aguado, V., Vitas, A. I., & Garcia-Jalón, I. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 90).
- Almeida, C., Azevedo, N. F., Santos, S., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. (2011). Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). *PLoS ONE*, 6(3), e14786.
- Álvarez-Gurrea, J. C. (2015). Evolución de la contaminación de superficies durante los procesos productivos en pymes del sector cárnico. Universidad de La Rioja.
- Arnold, J. W., Boothe, D. H., Suzuki, O., & Bailey, G. W. (2004). Multiple imaging techniques demonstrate the manipulation of surfaces to reduce bacterial contamination and corrosion. *Journal of Microscopy*, 216(Pt 3), 215–221.
- Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L., & Vogel, B. F. (2003). Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 66(4), 592–598.
- Bari, M.L., Kawasaki, S. (2014). Rapid Methods for Food Hygiene Inspection. In M. L. (Eds. Batt, C.A., Tortorello (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol. 3, pp. 269–279).
- Baumann, A. R., Martin, S. E., & Feng, H. (2009). Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *Journal of Food Protection*, 72(6), 1306–1309.
- Beuchat, L. R. (1996). *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control*, 7(4-5), 223–228.

- Bhagwat, A. A. (2003). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 84(2), 217–224.
- Bremer, P. J., Monk, I., & Butler, R. (2002). Inactivation of *Listeria monocytogenes* / *Flavobacterium spp.* biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Letters in Applied Microbiology*, 35(4), 321–325.
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., & Briandet, R. (2014). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(Special Issue on Predictive modelling in food), 167–178.
- Brown, C. M., Ellwood, D. C., & Hunter, J. R. (1977). Growth of bacteria at surfaces: Influence of nutrient limitation. *FEMS Microbiology Letters*, 1(3), 163–166.
- Bryers, J. D., & Ratner, B. D. (2004). Bioinspired Implant Materials Befuddle Bacteria
Researchers are designing materials that either shed microbes or prevent them from adhering to device surfaces. *ASM American Society for Microbiology News*, 70(5), 232–237.
- Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., de Meester, E. D., & Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3), 301–312.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 499–511.
- Chae, M. S., & Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1), 103–111.
- Chew, S. C., & Yang, L. (2016). Biofilms. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 407–415).

- Chia, T. W. R., Goulter, R. M., McMeekin, T., Dykes, G. A., & Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26(8), 853–859.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22–32.
- Cole, M. B., Jones, M. V., & Holyoak, C. (1990). The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 69(1), 63–72.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–45.
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867.
- Deming, M. S., Tauxe, R. V., Blake, P. A., Dixon, S. E., Fowler, B. S., Jones, T. S., ... Sikes, R. O. (1987). *Campylobacter enteritis* at a university: transmission from eating chicken and from cats. *American Journal of Epidemiology*, 126(3), 526–34.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890.
- Dourou, D., Beauchamp, C. S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K. E., Smith, G. C., Sofos, J. N. (2011). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 262–268.
- Dunn, K. A., Bielawski, J. P., Ward, T. J., Urquhart, C., & Gu, H. (2009). Reconciling ecological and genomic divergence among lineages of *Listeria* under an extended mosaic genome. *Molecular Biology and Evolution*, 26(11), 2605–15.
- EFSA. (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12(2), 3547.

- EFSA. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1), 3991.
- Eklund, M. W., Poysky, F. T., Paranjpye, R. N., Lashbrook, L. C., Peterson, M. E., & Pelroy, G. A. (1995). Incidence and Sources of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Fishery Products and Processing Plants. *Journal of Food Protection*, 5(7), 502–508.
- Enos-Berlage, J. L., Guvener, Z. T., Keenan, C. E., & McCarter, L. L. (2005). Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, 55(4), 1160–82.
- Faruque, S. M., Biswas, K., Udden, S. M. N., Ahmad, Q. S., Sack, D. A., Nair, G. B., & Mekalanos, J. J. (2006). Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6350–5.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150–70.
- Flemming, H.-C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the house of biofilm cells;. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945–7947.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623.
- Fletcher, M. (1980). Adherence of Marine Micro-organisms to Smooth Surfaces. In *Bacterial Adherence* (pp. 345–374). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Fletcher, M., & Loeb, G. I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonas to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(1), 67–72.
- Flint, S. H., Bremer, P. J., & Brooks, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11(1), 81–97.

- Frank, J. F., & Koffi, R. A. (1990). Surface-adherent Growth of *Listeria monocytogenes* is Associated with Increased Resistance to Surfactant Sanitizers and Heat. *Journal of Food Protection*, 53(7), 550–554.
- Fung, D. Y. C. (2002). Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(1), 3–22.
- Fuster-Valls, N., Hernández-Herrero, M., Marín-de-Mateo, M., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2008). Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, 19(3), 308–314.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1–15.
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049–1056.
- Garrido, V., Vitas, A. I., & García-Jalón, I. (2009). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. *Food Control*, 20(11), 986–991.
- Gilbert, R. J., McLauchlin, J., & Velani, S. K. (1993). The contamination of paté by *Listeria monocytogenes* in England and Wales in 1989 and 1990. *Epidemiology and Infection*, 110(3), 543–51.
- Gisella Kopper, Gloria Calderón, Sheryl Schneider, Wilfredo Domínguez, Guillermo Gutiérrez. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. *Informe Técnico Sobre Ingeniería Agrícola Y Alimentaria*, 6, 4–173.
- González, B. (2009). Enfermedades de Transmisión Alimentaria. Retrieved from <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/14765-enfermedades-transmision-alimentaria->
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gymoese, P., & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(10), 1165–1171.

- Guðbjörnsdóttir, B., Einarsson, H., & Thorkelsson, G. (2005). Microbial Adhesion to Processing Lines for Fish Fillets and Cooked Shrimp: Influence of Stainless Steel Surface Finish and Presence of Gram-Negative Bacteria on the Attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, 43(1), 55–61.
- Hanning, I., Jarquin, R., & Slavik, M. (2008). *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), 1199–1208.
- Harvey, J., & Gilmour, A. (1992). Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(2).
- Helke, D. M., & Wong, A. C. L. (1994). Survival and Growth Characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-N Rubber. *Journal of Food Protection*, 57(6), 963–968.
- Herald, P. J., & Zottola, E. A. (1988). Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel Surfaces at Various Temperatures and pH Values. *Journal of Food Science*, 53(5), 1549–1562.
- Hoffmann, S., Batz, M. B., & Morris, J. G. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1292–1302.
- Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1997). Growth Media and Surface Conditioning Influence the Adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* Cells to Stainless Steel. *Journal of Food Protection*, 60, 1034–1037.
- Howell, D., & Behrends, B. (2006). A review of surface roughness in antifouling coatings illustrating the importance of cutoff length. *Biofouling*, 22(5-6), 401–410.
- Huang, C. T., Yu, F. P., McFeters, G. A., & Stewart, P. S. (1995). Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6), 2252–2256.
- Itram Higiene. (2015). Biofinder: Solución innovadora para la detección de biofilms y contaminación en superficies. Vic (Barcelona).

- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., & Kaplan, J. B. (2008). Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 470–476.
- Jeong, D. K., & Frank, J. F. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* at 21°C in Biofilms with Micro-organisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments. *LWT - Food Science and Technology*, 27(5), 415–424.
- Jessen, B., & Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 265–269.
- Jiang, X., & Doyle, M. P. (1999). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Enteritidis* on currency. *Journal of Food Protection*, 62(7), 805–807.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*, 65(11), 1811–1829.
- Kim, K. Y., & Frank, J. F. (1994). Effect of Growth Nutrients on Attachment of *Listeria monocytogenes* To Stainless Steel. *Journal of Food Protection*, 8(5), 720–724.
- Kogure, K., Ikemoto, E., & Morisaki, H. (1998). Attachment of *Vibrio alginolyticus* to glass surfaces is dependent on swimming speed. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 932–937.
- Koo, O. K., Aroonnu, A., & Bhunia, A. K. (2011). Human heat-shock protein 60 receptor-coated paramagnetic beads show improved capture of *Listeria monocytogenes* in the presence of other *Listeria* in food. *Journal of Applied Microbiology*, 111(1), 93–104.
- Koo, O. K., Ndaletuye, J. B., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C., & Crandall, P. G. (2014). Influence of *Listeria innocua* on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel and aluminum surfaces. *Food Control*, 39, 135–138.
- Kumar, C. G., & Anand, S. . (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1), 9–27.

- Kusumaningrum, H. ., Riboldi, G., Hazeleger, W. ., & Beumer, R. . (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85(3), 227–236.
- Lasa, I. (2004). Biofilms bacterianos. *Actualidad SEM*.
- Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., Sasahara, K. C. (2010). Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2792–2802.
- Lee Wong, A. C. (1998). Biofilms in Food Processing Environments. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2765–2770.
- Lewis, K. (2001). MINIREVIEW Riddle of Biofilm Resistance. *American Society for Microbiology*, 45(4), 999–1007.
- Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Weaver, R. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine*, 319(13), 823–828.
- Little, B., Wagner, P., Ray, R., Pope, R., & Scheetz, R. (1991). Biofilms: An ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal of Industrial Microbiology*, 8(4), 213–221.
- Little, C. L., Pires, S. M., Gillespie, I. A., Grant, K., & Nichols, G. L. (2010). Attribution of human *Listeria monocytogenes* infections in England and Wales to ready-to-eat food sources placed on the market: adaptation of the Hald *Salmonella* source attribution model. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(7), 749–756.
- Lomonaco, S., Nucera, D., & Filipello, V. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, 172–183.
- López-Gálvez, F., Gil, M. I., Truchado, P., Selma, M. V., & Allende, A. (2010). Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot

- be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. *Food Microbiology*, 27(2), 199–204.
- Lynch, D. J., Fountain, T. L., Mazurkiewicz, J. E., & Banas, J. A. (2007). Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiology Letters*, 268(2), 158–165.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., & Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel, Glass, Polypropylene, and Rubber Surfaces After Short Contact Times. *International Association for Food Protection*.
- Marin, C., Hernandez, A., & Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 88(2), 424–431.
- Marshall, K. C. (1992). Biofilms: an overview of bacterial adhesion. *ASM American Society for Microbiology News*, 58, 202–207.
- Mattila-Sandholm, T., & Wirtanen, G. (1992). Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International*, 8(4), 573–603.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 327–356.
- Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M., & Capdeville, B. (Eds.). (1992). Biofilms. In *Science and Technology*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Meylheuc, T., Giovannacci, I., Briandet, R., & Bellon-Fontaine, M.-N. (2002). Comparison of the cell surface properties and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 65(5), 786–793.
- Midelet, G., & Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 262–270.

- Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., O'bryan, C., Crandall, P. G., ... Ricke, S. C. (2012). A Review of the Ecology, Genomics, and Stress Response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), 712–725.
- Mittelman, M. W. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2760–2764.
- Molecular Probes, I. (2004). LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits. *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits*.
- Montañez-Izquierdo, V. Y., Salas-Vázquez, D. I., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2012). Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control*, 23(2), 470–477.
- Møretrø, T., Hermansen, L., Holck, A. L., Sidhu, M. S., Rudi, K., & Langsrud, S. (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5648–5655.
- Mustapha, A., & Liewen, M. B. (1989). Destruction of *Listeria monocytogenes* by Sodium Hypochlorite and Quaternary Ammonium Sanitizers. *International Association for Food Protection*.
- Norwood, D. E., & Gilmour, A. (1999). Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 576–582.
- Norwood, D. E., & Gilmour, A. (2001). The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*, 33(4), 320–324.
- Notermans, S., Dormans, J. A. M. A., & Mead, G. C. (1991). Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: A review. *Biofouling*, 5(1-2), 21–36.

- Oh, D.-H., & Marshall, D. L. (1996). Monolaurin and Acetic Acid Inactivation of *Listeria monocytogenes* Attached to Stainless Steel. *Journal of Food Protection*, 3(4), 249–252.
- OMS. (2002). Safer food for better health. *WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/fsf>
- OMS. (2015). OMS: Enfermedades de transmisión alimentaria. *WHO*.
- Osaili, T. M., Alaboudi, A. R., & Nesiar, E. A. (2011). Prevalence of *Listeria spp.* and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control*, 22(3), 586–590.
- País, E. El. (2000). Tres nuevos casos de listeriosis detectados en Francia.
- Pan, Y., Breidt, F., & Gorski, L. (2010). Synergistic Effects of Sodium Chloride, Glucose, and Temperature on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1433–1441.
- Panisello, P. J., Rooney, R., Quantick, P. C., & Stanwell-Smith, R. (2000). Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 221–234.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M., & Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 131–144.
- Pini, P. N., & Gilbert, R. J. (1988). A comparison of two procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw chickens and soft cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 7(4), 331–337.
- Pontefract, R. D. (1991). Bacterial Adherence: Its Consequences in Food Processing. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24(3), 113–117.
- Rajkowski, K. T. (2009). Biofilms in fish processing. In N. W. Fratamico, P. M.; Annous, B. A.; Gunther (Ed.), *Biofilms in the Food and Beverage Industries* (pp. 499–516). Cambridge: Elsevier.

- Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S., & Bayles, K. W. (2007). The cid-A murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 8113–8118.
- Rönner, A. B., & Wong, A. C. L. (1993). Biofilm Development and Sanitizer Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-n Rubber. *International Association for Food Protection*.
- Salo, S., Ehavald, H., Raaska, L., Vokk, R., & Wirtanen, G. (2006). Microbial surveys in Estonian dairies. *LWT - Food Science and Technology*, 39(5), 460–471.
- Sanders, S. Q., Boothe, D. H., Frank, J. F., & Arnold, J. W. (2007). Culture and detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 70(6), 1379–1385.
- Sapers, G. M. (2001). Efficacy of Washing and Sanitizing Methods for Disinfection of Fresh Fruit and Vegetable Products. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 305–311.
- Sasahara, K. C., & Zottola, E. A. (1993). Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Utilizes a Primary Colonizing Microorganism in Flowing Systems. *Journal of Food Protection*, 12, 1022–1028.
- Scardino, A. J., Harvey, E., & De Nys, R. (2006). Testing attachment point theory: diatom attachment on microtextured polyimide biomimics. *Biofouling*, 22(1-2), 55–60.
- Schöbitz, R., Ciampi, L., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes*: Un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, 37(1), 1–8.
- Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, 19(6), 627–636.
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407–413.

- Shikongo-Nambabi, M., Kachigunda, B., & Venter, S. (2010). Evaluation of oxidising disinfectants to control *Vibrio* biofilms in treated seawater used for fish processing. *Water SA*, 36(3), 215–220.
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2006). Control of Flow-Generated Biofilms with Surfactants. *Food and Bioproducts Processing*, 84(4), 338–345.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585.
- Suslow, T. V. (2001). Water Disinfection A Practical Approach to Calculating Dose Values for Preharvest and Postharvest Applications. *Agriculture and Natural Resources*, 7256, 1–4.
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 1), 3–9.
- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236–1243.
- Swissinfo. (2015). *Listeria* outbreak under control - SWI. Retrieved from <http://www.swissinfo.ch/eng/listeria-outbreak-under-control/4548976>
- Taylor, R., Maryan, C., & Verran, J. (1998). Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 80(5), 592–597.
- Thimothe, J., Nightingale, K. K., Gall, K., Scott, V. N., & Wiedmann, M. (2004). Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. *Journal of Food Protection*, 67(2), 328–341.
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1117–1131.

- Van Loosdrecht, M. C. M., Norde, W., & Zehnder, A. J. B. (1990). Physical Chemical Description of Bacterial Adhesion. *Journal of Biomaterials Applications*, 5(2), 91–106.
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W. Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 584–640.
- Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J., & Brözel, V. S. (2009). DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* Requires Extracellular DNA To Form Biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), 2861–2868.
- Vogel, B. F., Jørgensen, K., Christensen, H., Olsen, J. E., & Gram, L. (1997). Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the Basis of Whole-Cell Protein Profiles, Ribotyping, Phenotypic Characterization, and 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Applied and environmental microbiology*, 63(6), 2189–2199.
- Waak, E., Tham, W., & Danielsson-Tham, M.-L. (2002). Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3366–3370.
- Wagner, M., Auer, B., Trittmittel, C., Hein, I., & Schoder, D. (2007). Survey on the *Listeria* contamination of ready-to-eat food products and household environments in Vienna, Austria. *Zoonoses and Public Health*, 54(1), 16–22.
- Westermann, A. J., Gorski, S. A., & Vogel, J. (2012). Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 618–630.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487.
- WHO. (2007). The world health report 2007: Global public health Security in the 21st century. *World Health Organization*.
- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L., & Batt, C. A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity*, 65(7), 2707–2716.

- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., & Boor, K. J. (2000). Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2085–2095.
- Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H.-C. (1999). What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances* (pp. 1–19). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Wirtanen, G., & Mattila-Sandholm, T. (1993). Epifluorescence Image Analysis and Cultivation of Foodborne Biofilm Bacteria Grown on Stainless Steel Surfaces. *International Association for Food Protection*.
- Xue, Z., Sendamangalam, V. R., Gruden, C. L., & Seo, Y. (2012). Multiple roles of extracellular polymeric substances on resistance of biofilm and detached clusters. *Environmental Science & Technology*, 46(24), 13212–13219.
- Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 153(5), 1318–1328.
- Yuste, R. (2005). Fluorescence microscopy today. *Nature Methods, Published Online*: 2(12), 902.
- Zitz, U., Zunabovic, M., Domig, K. J., Wilrich, P.-T., & Kneifel, W. (2011). Reduced detectability of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 74(8), 1282–1287.
- Zottola, E. A. (1991). Characterization of the attachment matrix of *Pseudomonas fragi* attached to non-porous surfaces. *Biofouling*, 5(1-2), 37–55.